

**Posttranslationale Modifikation von nichtribosomalen
Peptidsynthetasen durch die
4'-Phosphopantetheinyl Transferase Sfp: Biochemische Analyse,
Substraterkennung und Modell zum Reaktionsmechanismus**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Mohammad Reza Mofid
aus Teheran-IRAN

Marburg an der Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 16.01.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. L. O. Essen

Tag der Disputation am 04. Feb. 2003

Zusammenfassung

In nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) werden die Synthese-Intermediate durch den 4'-Phosphopantethein-Kofaktor (4'-Ppant) kovalent an das sogenannte Carrier-Protein (CP) gebunden. Die Reaktionsabfolge, die schlussendlich zum fertigen Produkt führt, wird deshalb konsequenterweise mit dem *multiple carrier thiotemplate*-Modell beschrieben. Ähnliche Vorgänge werden in Polyketidsynthetasen (PKS) und Fettsäuresynthetasen (FAS) beobachtet. Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) modifizieren in dieser Synthesemaschinerie die inaktiven apo-Carrier-Proteine (apo-CP) von NRPS, PKS und FAS zu ihren aktiven holo-Formen. Dabei katalysieren sie den nukleophilen Angriff des invarianten Serinrestes im Core T Motiv der Carrier-Proteine auf das β -Pyrophosphat des CoAs. Diese Reaktion ist von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen abhängig. Ein prominenter Vertreter der PPTasen ist Sfp aus *B. subtilis*, welches für die Biosynthese des Lipoheptapeptids Surfactin essentiell ist.

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand, ausgehend von der Kokristallstruktur von Sfp mit CoA, die Charakterisierung der posttranslationalen Modifikation von NRPS mit Sfp. Dabei sollten insbesondere die Reste, die zur beidseitigen Protein-Protein Erkennung führen, bestimmt und untersucht werden. Anhand der Sequenz und Substratspezifität werden die PPTasen in drei Gruppen unterteilt: Sfp-, AcpS- und FAS2-Typ. Innerhalb der PPTasen werden drei Core Motive (P1, P2 und P3) beobachtet. Die Reihenfolge dieser Core Motive unterscheidet sich bei AcpS- und FAS2-Typ-PPTasen (P2, P3, P1) vom Sfp-Typ (P1, P2, P3). Sfp zeigt im Vergleich zu den anderen PPTasen eine breite Substratspezifität und modifiziert sowohl PCP als auch ACP aus NRPS, PKS und FAS. Durch Vergleich der Sekundärstruktur des trimer aufgebauten AcpS aus *B. subtilis* und *S. pneumoniae* mit dem pseudo-homodimeren Sfp kann ein monomeres Faltungsmotiv aus β -Faltblatt (1) α -Helices (3) β -Faltblatt (2) beobachtet werden. Durch die Analyse von Strukturdaten und Punktmutationen in Sfp kann man die Struktur von Sfp in vier Bereiche unterteilen: (a) CoA-Bindungstasche, (b) PCP-Bindungstasche, (c) katalytische Tasche und (d) Homodimer-Interface. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten ermöglichen eine Hypothese für den Reaktionsmechanismus welcher dem bisherigen Modell entgegensteht. Dabei wird postuliert, dass der hoch konservierte Rest E151 als Base fungiert und die Hydroxyl-Gruppe des invarianten Serinrestes deprotoniert.

Die α -Helix 2 der PCP dient wahrscheinlich als Protein-Protein-Interaktionsregion mit den PPTasen. Durch den Austausch dieser Region bzw. Mutation zu den korrespondierenden Resten aus ACP, werden die hybriden bzw. veränderten PCP auch von AcpS *in vivo* und *in vitro* modifiziert und können somit als universelle PCP bezeichnet werden. Die Erkennung von PPTase und CP beruht auf den Oberflächenladungen und Hydrophobizitäten der beiden Proteine, die im Falle der CP maßgeblich durch die Helix 2 beeinflusst werden. Zusätzlich spielt bei dem universellen PCP die Aminosäure K47 bei der Erkennung von AcpS eine entscheidende Rolle. Die Erkennungsregion für die PPTase liegt im Bereich der α -Helix 2 des CPs; die Erkennungsregion für CPs ist im Falle von AcpS die α -Helix1, bei Sfp die Schleife zwischen β 4- α 5.

Ein weiterer Hinweis für die Universalität der neuen PCP ist die unverminderte Interaktion auch innerhalb von NRPS Modulen. Lediglich der Kontakt zur E-Domäne ist gestört. Bei der Inkubation des Konstruktes hTycA(A-hPCP-E) mit ProCATV3-LeuCAT-Te wird nach der Modifikation durch AcpS nur das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP gebildet. Die gleichen Konstrukte, modifiziert mit Sfp, produzieren dagegen das Tripeptid D-Phe-L-Pro-L-Leu.

In dieser Arbeit wurde auch die Grundlage für die Strukturaufklärung von zwei Domänen, der Epimerisierung-(E)-Domäne aus Tyrocidin Synthetase B und der externen Thioesterase II (TEII) aus Surfactin Synthetase D, geschaffen. Die TycB3-E-Domäne gehört zu den Peptidyl-S-Ppant Racemasen. Die Kristalle dieser Domäne sind hexagonal planar und streuen bis zu 3,5Å. Die TEII ist ein sogenanntes Reinigungsenzym in NRPS und spaltet an falsch modifizierten PCP den Thioester ab. Die TEII-Domäne wurde für NMR-spektroskopische Untersuchungen einfach, zweifach oder dreifach mit ^{15}N , 2H und ^{13}C markiert.

Meiner Frau
Sharareh

1. Abkürzungen und Symbole	4
2. Einleitung.....	8
2.1. Physiologische Bedeutung, Struktur und Anwendung von nichtribosomal synthetisierten Peptiden	8
2.2. Aufbau von Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)	11
2.3. Die Funktionen der einzelnen Domänen	13
2.3.1. Die Adenylierungs-(A)-Domäne	14
2.3.2. Die Carrier-Protein-(CP)-Domäne	16
2.3.3. Die Kondensations-(C)-Domäne	20
2.3.4. Die Terminations-(Te)-Domäne	21
2.3.5. Optionale Modifikationsdomänen	23
2.3.5.1. Epimerisierungs-(E)-Domäne.....	23
2.4. Posttranslationale Modifikation durch 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen)	24
2.5. Die externe Thioesterase-(TEII)-Domäne	28
2.6. Die 4'-Ppant-Abhängigen Multienzymkomplexe	29
2.6.1. Domänen-Organisation in PKS und FAS	29
2.6.2. Die quartärstrukturen von FAS, PKS und NRPS	30
2.7. Aufgabenstellung	32
3. Material.....	34
3.1. Enzyme, Chemikalien, und Kits	34
3.2. Geräte.....	36
3.3. Mikroorganismen.....	37
3.3.1. Escherichia coli XL1-Blue	37
3.3.2. Escherichia coli BL21 (λ DE3):	37
3.3.3. Escherichia coli M15	37
3.3.4. Escherichia coli SG13009	37
3.3.5. Bacillus brevis ATCC 8185.....	38
3.4. Medien und Lösungen	38
3.5. Vektoren:	39
3.5.1. pQE60 und pQE70.....	39
3.5.2. pREP4	39
3.5.3. pTZ18	40
3.5.4. pASK-IBA 3	40
4. Methoden	41
4.1. Molekularbiologische Methoden – DNA Techniken	41
4.1.1. PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	41
4.1.2. Gezielte Punktmutagenese.....	43
4.1.3. DNA-Sequenzierung	43
4.2. Protein-Techniken	44
4.2.1. Genexpression	44
4.2.2. Präparation von Rohzelleextrakten	46
4.2.3. Native Aufreinigung der His ₆ -Tag Fusionsproteine	46
4.2.4. Dialyse von Proteinlösungen	47
4.2.5. Denaturierende Aufreinigung der His ₆ -Tag Fusionsproteine mittels IMAC	47
4.2.6. Rückfaltung von denaturierend aufgereinigten Proteinen:	48
4.2.7. Aufreinigung mit Strep-Tactin Säulen	48
4.3. Biochemische Untersuchungen	49

4.3.1. Priming Assay für die Aktivität der PPTase (Phosphopantetheinylierungsassay für CP)	49
4.3.2. Assay für die Aktivität der A-Domäne (ATP-PP _i -Austauschassay)	50
4.3.3. Aminoacylierung von PPS-Modulen (Beladungsassay).....	51
4.3.4. Epimerisierungsassay	52
4.3.5. Kondensierungsassay:	53
4.4. Biophysikalische Untersuchungen	54
4.4.1. Reversed Phase HPLC-Analyse	54
4.4.2. HPLC-ESI-MS.....	55
4.4.3. MALDI-TOF	57
4.4.4. Circular dichroismus (CD)	58
4.4.5. BIAcore	59
4.4.6. 3D-Strukturaufklärung.....	61
5. Ergebnisse.....	65
5.1. Struktur-Funktionsanalyse in Sfp	65
5.1.1. Strategie	65
5.1.2. Strukturanalyse von Sfp-CoA Kokristallen.....	65
5.1.3. Charakterisierung der posttranslationalen Modifikation von CP mit Sfp	67
5.1.4. Mutationsanalyse von Sfp	72
5.1.5. BIAcore Untersuchung von Sfp und Sfp H90A	80
5.2. Gezielte Anpassung von PCPs an AcpS zur posttranslationalen Modifikation	83
5.2.1. Erkennung von NRPS durch AcpS.....	84
5.2.2. Konstruktion einer PCP-Verkürzungsmutante	105
5.3. Strukturanalyse der E-Domäne und TEII	107
5.3.1. Strukturstudien anderer rekombinanter NRPS-Fragmente:.....	108
5.3.2. Strukturbestimmung von TEII Srf-TE.....	110
Diskussion und Ausblick	112
6.1. Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase).....	112
6.1.1. Die Bedeutung der PPTasen	112
6.1.2. Vielfältige Einsatzmöglichkeiten der PPTase Sfp.....	113
6.1.3. Strukturvergleich von Sfp mit AcpS	113
6.1.4. Mutationsanalyse	116
6.2. Konstruktion eines universellen Peptidyl-Carrier-Proteins	122
6.2.1. Erkennung von universellen PCPs durch AcpS und Sfp.....	123
6.2.2. Strukturmodell eines universellen Peptidyl-Carrier-Proteins.....	124
6.2.3. Die Protein-Protein-Erkennung in CPs und PPTasen.....	125
6.2.4. Protein-Protein Interaktion universeller PCP mit Domänen und Modulen	127
6.2.5. Protein-Protein Interaktion von CP mit Domänen und Modulen von NRPS, PKS und FAS	129
6.3. Ausblick	130
6.3.1 PPTasen:	130
6.3.2. Neue Erkenntnisse durch Strukturaufklärung verschiedener NRPS-Domänen ...	131
7. Literatur	133
8. Anhang.....	144
8.1: Core-Motiv:	144
8.1.1. Core-Motiv der wichtigsten Domänen von Peptidsynthetasen.	144
8.1.2. Core-Motiv von PPTasen.	144
8.2 Oligonukleotide	145
8.3. Screening-Lösungen zur Kristallisation	147

8.3.1. Screening Lösungen nach "Hampton Research"	147
8.3.2. Screening Lösungen nach "Jancarik und Kim" (Factorials).....	151
8.4. NMR-Spektren von TEII aus Srf-TE (B. subtilis).....	155
8.5 Sequenzidentität von TycC3-PCP und ACP aus FAS B. subtilis mit verschiedenen PCP und ACP	156

1. Abkürzungen und Symbole

Tabelle 1.1: Allgemein benutzte Abkürzungen:

A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Ac	Acetat
ACP	Acyl-carrier-Protein
AcpS	Acyl-carrier-Protein-Synthase
ADP	Adenosin-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp ⁿ	Ampicillin(µn/mL Endkonzentration)
APS	Ammoniumpersulfat
ArCP	<u>A</u> ryl- <u>C</u> arrier- <u>P</u> rotein
As	Aminosäure(n)
ATCC	Stammsammlung (engl. <i>American type culture collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bdH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
BacA, B, C, <i>bacA</i> , B, C	Bacitracin-Synthetase A, B, C (-gen)
Bla, <i>bla</i>	β-Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BSA	Rindeserumalbumin (bovine serum albumin)
C-Domäne	Kondensationsdomäne
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
Ci	Curie
CoA	Koenzym A (engl. <i>coenzyme A</i>)
CP	<u>C</u> arrier- <u>P</u> rotein
CPM	gezählte Zerfälle pro Minute (engl. <i>counts per minute</i>)
dH ₂ O	entionisiertes Wasser
DCP	D-Alanyl-Carrier-Protein
DKP	Diketopiperazin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAS2	Fettsäure-Synthase 2 (<i>fatty acid synthase</i>)
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
GrsA, B, <i>grsA</i> , B	Gramicidin-Synthetase A, B, (-gen)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie(engl. <i>Hydrophobic interaction chromatography</i>)
hPCP	Hybrid PCP/ACP Peptidyl-Carrier-Protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (engl. <i>Immobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan ⁿ	Kanamycin (µn/mL Endkonzentration)
kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
L	Liter
MCS	multipler Klonierungsbereich (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure monohydrat
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
Na	Natrium
NaAc	Natrium Acetat
NaCi	Natrium Ziträt
NTA	Nitrilotriacetat
OD _l	optische Dichte bei der Wellenlänge l [nm]
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
4'-Ppant	4'-Phosphopantetheinyl-Rest
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PP _i	anorganisches Pyrophosphat (engl. <i>inorganic pyrophosphate</i>)
PPTase	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
ProCAT	TycB1 aus Tyrocidin-Synthetase
RNA	Ribonucleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s	Sekunde(n)
Se-Met	Selenomethionin
Sfp	Sfp mit 6-Histidin-Tag
Sfp-H ₆	Sfp mit 6-Histidin-Tag
TCA	Trichloressigsäure (engl. <i>tri-chloro-acetic acid</i>)
Te-Domäne	Terminationsdomäne bzw. Thioesterasedomäne
TEII	Externe Thioesterasedomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TycA, B, C, <i>tycA, B, C</i>	Tyrocidin-Synthetase A, B, C (-gen)
u	Enzymeinheit (engl. <i>unit</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
wt-Sfp	Sfp ohne 6-His-Tag
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
X-Gla	5'-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
X-Pho	5'-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

Tabelle 1.2: Aminosäuren und wichtige Verbindungen: Abkürzungen und Molekulargewichte

Aminosäure	drei (ein) Buchstabenkode	MW [g·mol⁻¹]	pK_R (Seiten Gruppe)
Alanin	Ala (A)	89	-
Arginin	Arg (R)	174	12.48
Asparagin	Asn (N)	132	-
Asparaginsäure	Asp (D)	133	3.90
Asn oder Asp	Asx (B)	-	-
Cystein	Cys (C)	121	8.33
Glutamin	Gln (Q)	146	-
Glutaminsäure	Glu (E)	147	4.07
Gln oder Glu	Glx (Z)	-	-
Glycin	Gly(G)	75	-
Histidin	His (H)	155	6.04
Isoleucin	Ile (I)	131	-
Leucin	Leu (L)	131	-
Lysin	Lys (K)	146	10.79
Methionin	Met (M)	149	-
Phenylalanin	Phe (F)	165	-
Prolin	Pro (P)	115	-
Ornithin	Orn	132	-
Serin	Ser (S)	105	13
Threonin	Thr (T)	119	13
Tryptophan	Trp (W)	204	-
Tyrosin	Tyr (Y)	181	10.13
Valin	Val (V)	117	-
Coenzym A	CoA	767	-
Coenzym A- Trinatriumsalz	CoA-Na ₃	809	-

Tabelle 1.3: Genetische Codierung der Aminosäuren.

(5'-Ende)	U	C	A	G	(3'-Ende)
U	Phe (21,8) ¹	Ser (9,2)	Tyr (16,4)	Cys (5,1)	U
U	Phe (16,6)	Ser (8,9)	Tyr (12,3)	Cys (6,4)	C
U	Leu (13,6)	Ser (7,7)	Term (2,0)	Term (1,0)	A
U	Leu (13,2)	Ser (8,7)	Term (0,3)	Trp (14,4)	G
C	Leu (11,2)	Pro (7,1)	His (12,6)	Arg (20,9)	U
C	Leu (10,6)	Pro (5,3)	His (9,7)	Arg (21,4)	C
C	Leu (3,9)	Pro (8,5)	Gln (14,6)	Arg (3,6)	A
C	Leu (51,5)	Pro (22,6)	Gln (29,0)	Arg (5,6)	G
A	Ile (29,7)	Thr (9,5)	Asn (18,3)	Ser (9,0)	U
A	Ile (24,9)	Thr (22,9)	Asn (21,8)	Ser (15,6)	C
A	Ile (5,1)	Thr (7,7)	Lys (34,4)	Arg (2,6)	A
A	Met (27,3)	Thr (14,0)	Lys (11,3)	Arg (1,6)	G
G	Val (19,0)	Ala (16,1)	Asp (32,2)	Gly (25,3)	U
G	Val (14,9)	Ala (25,1)	Asp (19,5)	Gly (28,9)	C
G	Val (11,2)	Ala (20,5)	Glu (39,8)	Gly (8,4)	A
G	Val (25,7)	Ala (32,6)	Glu (18,5)	Gly (11,1)	G

¹ Die Zahlen in Klammern repräsentieren die prozentuelle Häufigkeit in *E. coli*.

2. Einleitung

Eine große Zahl von bioaktiven, niedermolekularen peptidischen Verbindungen, die ein breites Wirkspektrum von antibiotischer bis zu immunsuppressiver und zytostatischer Wirkung besitzen, wird von Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien produziert. Diese Verbindungen werden entweder ribosomal oder nichtribosomal hergestellt (Marahiel *et al.*, 1997b; Stachelhaus *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 1996).

In der ribosomalen Peptidbiosynthese werden die Peptide anhand von mRNA-Matrizen synthetisiert, nach der Translation zumeist modifiziert und prozessiert, bevor sie von der Zelle sekretiert werden. Wichtigste Vertreter dieser Klasse sind die u.a. die von Gram-positiven Mikroorganismen produzierten Lantibiotika (Jung, 1991) wie z.B. das Subtilin aus *Bacillus subtilis* (Nishio *et al.*, 1983).

In der nichtribosomalen Peptidbiosynthese werden diese Peptide durch große multimodulare Enzymkomplexe, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt, die gleichzeitig das Templat und die Biosynthesemaschinerie darstellen. Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind die Penicillin- und Cephalosporin-Vorstufen, das Bacitracin und das Vancomycin, die alle eine pharmakologisch und biotechnologisch wichtige Bedeutung haben (Aharonowitz *et al.*, 1992; Gutierrez *et al.*, 1991; Konz *et al.*, 1997; van Wageningen *et al.*, 1998).

Die Untersuchung der posttranslationalen Modifikation, die eine inaktive apo-NRPS in ihre aktive holo-Form überführt, ist das Thema der vorliegenden Arbeit. Dabei steht die essentielle 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp und deren Protein-Protein-Interaktion mit den Carrier-Proteinen (CP) im Vordergrund.

2.1. Physiologische Bedeutung, Struktur und Anwendung von nichtribosomal synthetisierten Peptiden

Die nichtribosomal synthetisierten Peptide werden im wesentlichen von Bakterien der Gattung *Streptomyces* und *Bacillus* produziert (einige ausgewählte Beispiele sind in Abb. 2.1 dargestellt).

Die physiologische Rolle dieser Peptide im Produzentenstamm ist oftmals ungeklärt (Davis and Chater, 1990). Es wird spekuliert, dass die nichtribosomal produzierten Peptide eine regulatorische Funktion besitzen, die etwa für die Zelldifferenzierungen und den Sporulationsprozess wichtig ist (Marahiel, 1992a). Einige dieser Peptide (wie z.B. das Bacillibactin (2)) sind Fe^{3+} -Chelatbildender (May *et al.*, 2001), die unter

Eisenmangelbedingungen produziert werden und für die Versorgung der Zelle mit dem Spurenelement essentiell sind. Es wird auch spekuliert, dass manche nichtribosomal synthetisierten Peptide als Kampfstoff gegen konkurrierende Mikroorganismen dienen wie z.B. Tyrocidin A (**5**) (Walsh, 2000).

Die wichtigste und zugleich interessanteste Eigenschaft der nichtribosomalen Peptide ist die mögliche Inkorporation von nicht Standard-Aminosäuren sowie Karbon- oder Hydroxysäuren (Marahiel *et al.*, 1997b). So enthalten Verbindungen wie z.B. das Tyrocidin A (**5**) die nichtproteinogene Aminosäure Ornithin, Vancomycin (**4**) Hydroxyphenyl- und Dihydroxyphenyl-Glycin, Cyclosporin (**3**) N-methylierte Aminosäuren, Bacillibactin (**2**) und Vibriobactin (**1**) die Karbonsäure 2'-3'-Dihydroxybenzoat, Myxothiazol (**8**) den heterozyklischen Thiazolring, Surfactin (**7**) eine β -Fettsäure und Bleomycin A2 (**6**) Insertionen von Acetat- und Propionateinheiten.

Die strukturelle Vielfalt nichtribosomal synthetisierter Peptide spiegelt das breite Spektrum ihrer biologischen Aktivität wider. Einige nichtribosomal synthetisierte Peptide sind auch von großer pharmakologischer Bedeutung. Das Penicillin, Cephalosporin, Tyrocidin A (**5**) und Gramicidin S wirken antibiotisch (Byford *et al.*, 1997; Hori *et al.*, 1989; Mootz and Marahiel, 1997; Saito *et al.*, 1994; Turgay *et al.*, 1992), Cyclosporin (**3**) ist ein Immunsuppressivum und wird bei der Nachsorge von Organtransplantationen eingesetzt (Weber *et al.*, 1994), Bleomycin (**6**) (Du *et al.*, 2000) besitzt zytostatische Wirkung und kann somit in der Antitumorthherapie eingesetzt werden. Vancomycin (**4**) (van Wageningen *et al.*, 1998) ist zur Zeit das wichtigste Reserveantibiotikum.

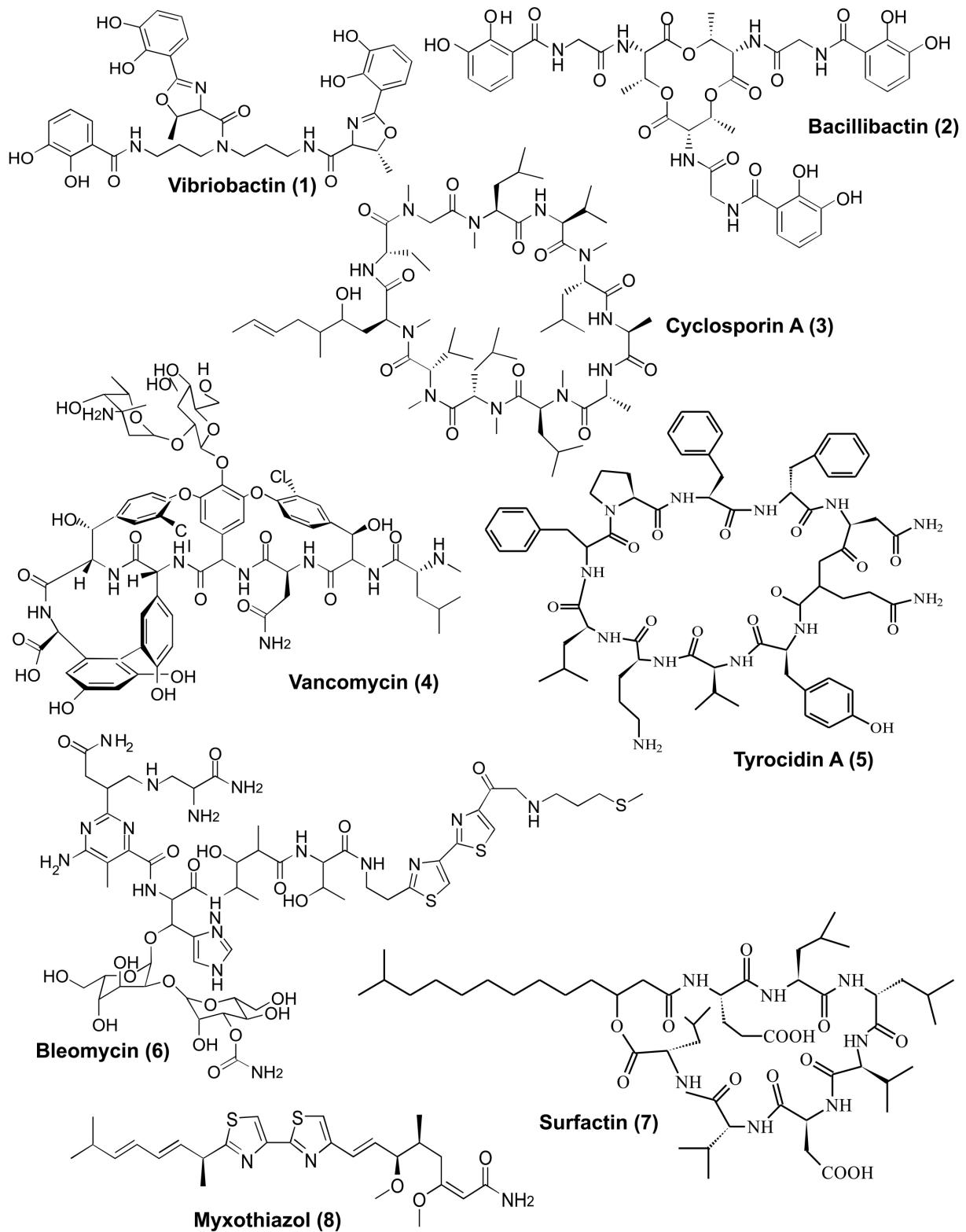


Abb. 2.1: Einige Beispiele für nichtribosomal synthetisierte Peptide. (1) Vibriobactin, (2) Bacillibactin, (3) Cyclosporin A, (4) Vancomycin, (5) Tyrocidin A, (6) Bleomycin, (7) Surfactin und (8) Myxothiazol werden durch der nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert. Die zugehörigen Biosynthese-Gene sind in Abb. 2.2 dargestellt.

Die NRPS sind große multimodulare Enzymkomplexe. Die pilzlichen Peptidsynthetasegene kodieren oft für ein einziges NRPS Protein, Beispiel hierfür ist das Cyclosporin A (3) mit

einer Größe von 1,6 MDa. Bakterielle Peptidsynthetasegene sind oft in Operonstrukturen organisiert, die sich über einen Bereich bis zu 60 kbp erstrecken können (van Wageningen *et al.*, 1998). Beispiel hierfür ist das Surfactin (7), das von den drei Synthetasen SrfA-A, SrfA-B und SrfA-C mit einer Größe von 402, 401 und 144 kDa synthetisiert wird. Eine schematische Darstellung der Organisation einiger NRPS-Gene findet sich in Abb. 2.2.

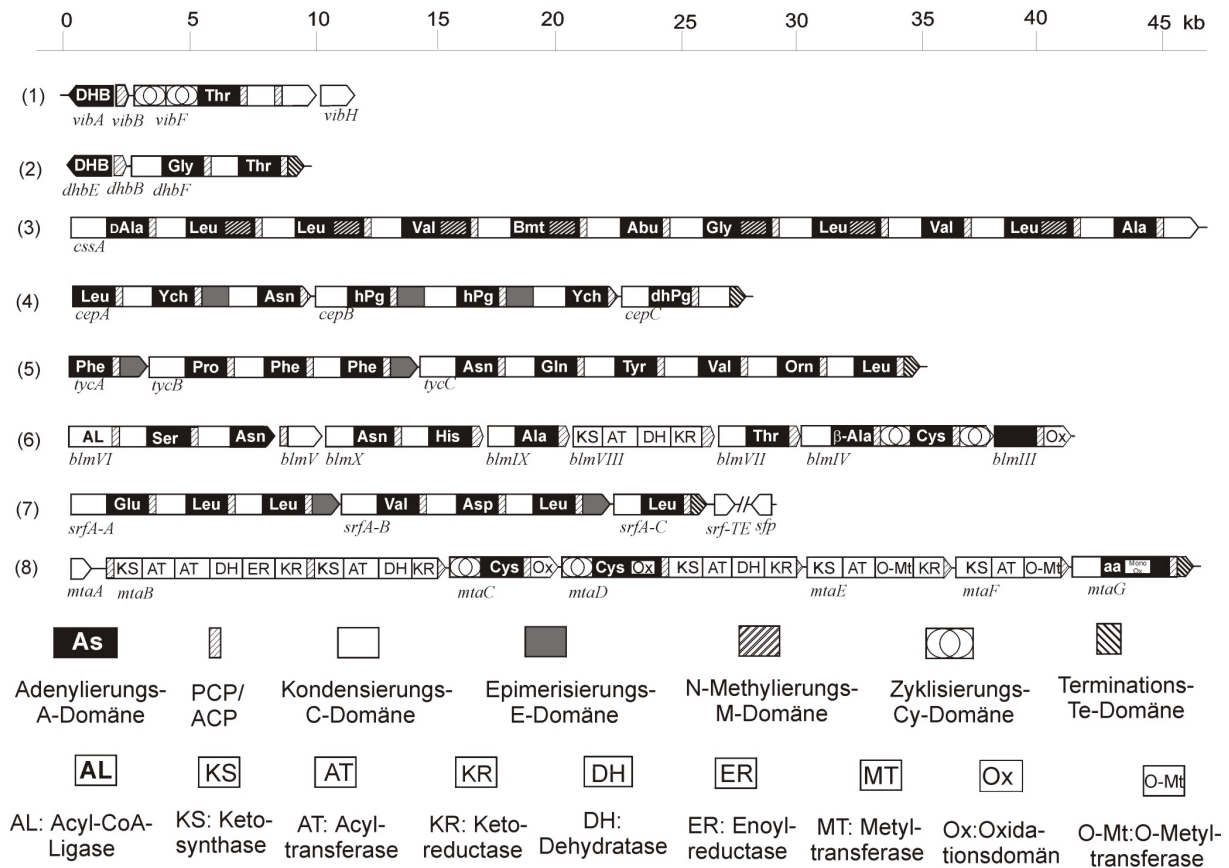


Abb. 2.2: Peptidsynthetasen kodierende Gen-Kluster. Gezeigt sind Beispiele von pilzlichen (3) und bakteriellen (1, 2, 4, 5, 6, 7, und 8) Genen und deren korrespondierenden Peptidsynthetasen. Die Gene sind in der Synthese von (1) Vibriobactin aus *Vibrio cholerae* (Keating *et al.*, 2000; Payne and Finkelstein, 1978) (2) Bacillibactin aus *B. subtilis* (May *et al.*, 2001), (3) Cyclosporin A aus *Tolypocladium niveum* (Weber *et al.*, 1994), (4) Vancomycin aus *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen *et al.*, 1998), (5) Tyrocidin aus *B. brevis* (Mootz and Marahiel, 1997), (6) Bleomycin aus *Streptomyces verticillus* (Du *et al.*, 2000), (7) Surfactin aus *B. subtilis* (Cosmina *et al.*, 1993) und (8) Myxothiazol aus *Stigmatella auranticac* (Silakowski *et al.*, 1999) involviert. *vibD*, *sfp* und *mtaA* sind kodierende Gene für die entsprechenden PPTasen (Keating *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1992; Silakowski *et al.*, 1999), das Genprodukt von *srf-TE* ist eine sogenannte Typ II Thioesterase (Schneider and Marahiel, 1998). DHB: 2'-3'-Dihydroxybenzoat, Bmt: (4R)-4[(E)-2-Butenyl-4-methyl-L-threonin], Abu: L- α -Aminobuttersäure, Ych: m-Chloro- β -hydroxyl-L-tyrosin, hPg: 4-Hydroxy-L-phenylglycin, dhPg: 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin und Orn: L-Ornithin.

2.2. Aufbau von Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)

Sequenzvergleiche und biochemische Untersuchungen der NRPS weisen auf einen modularen Aufbau hin (Schwarzer and Marahiel, 2001; Stachelhaus and Marahiel, 1995a; Weber and Marahiel, 2001). Ein Modul ist für die Erkennung, Aktivierung, kovalente Bindung und

Einbau eines Substratbausteins in das Peptidprodukt verantwortlich. Die Reaktionsabfolge wird mit dem *multiple Carrier thiotemplate*-Modell beschrieben (Stein *et al.*, 1996). Hierbei dient das Enzym als Matrize für die Synthese des Produktes. Die Zahl von Modulen und ihre Reihenfolge innerhalb des Peptidsynthetase stimmt dabei meist mit der Primärstruktur des Produktes überein. Von diesem als Kolinearitätsregel bezeichneten Grundsatz werden jedoch immer häufiger Ausnahmen entdeckt, bei denen die Anzahl der Module nicht mehr der Anzahl der Bausteine entspricht (Mootz *et al.*, 2002b). In solchen Fällen kann z.B. die Matrize mehrfach genutzt werden, um ein Produkt zu erstellen wie z.B. beim Vibriobactin (Keating *et al.*, 2000). Die Synthese der Peptidprodukte beginnt mit dem sog. Initiationsmodul der NRPS. Durch die schrittweise Elongation der Intermediate vom N- zum C-Terminus der NRPS verlängert sich die Peptidkette um einen Baustein, bis sie schliesslich durch ein sogenanntes Terminationsmodul als fertiges Produkt abgespalten wird. Das Prinzip der NRPS ist anhand der Synthese des zyklischen Lipoheptapeptids Surfactin aus *B. subtilis* in Abb. 2.3 verdeutlicht. Insgesamt sind 7 Module auf den 3 NRPS-Proteinen SrfA-A, SrfA-B und SrfA-C verteilt (Arima *et al.*, 1968). Für die Initiation vermutet man, dass eine ca. 40 kDa große, CoA-abhängige Transacylase eine C13 bis C15 lange β -Hydroxy-Fettsäure bindet und diese durch die N-terminale C-Domäne auf SrfA-A übertragen wird (Menkhaus *et al.*, 1993). Entlang des Proteintemplates werden als Thioester an den 4'-Pant-Arm die zuvor aktivierten AS gebunden und durch die Kondensationsdomänen zum Oligopeptid verknüpft. Die repetitive Abfolge führt zu der enzymgebundenen Peptidkette am letzten Modul (SrfA-C). Dort wird das lineare Lipoheptapeptid auf den Serinrest der Terminationsdomäne transferiert. Hier wird durch Lactonisierung das Lipoheptapeptid abgespalten.

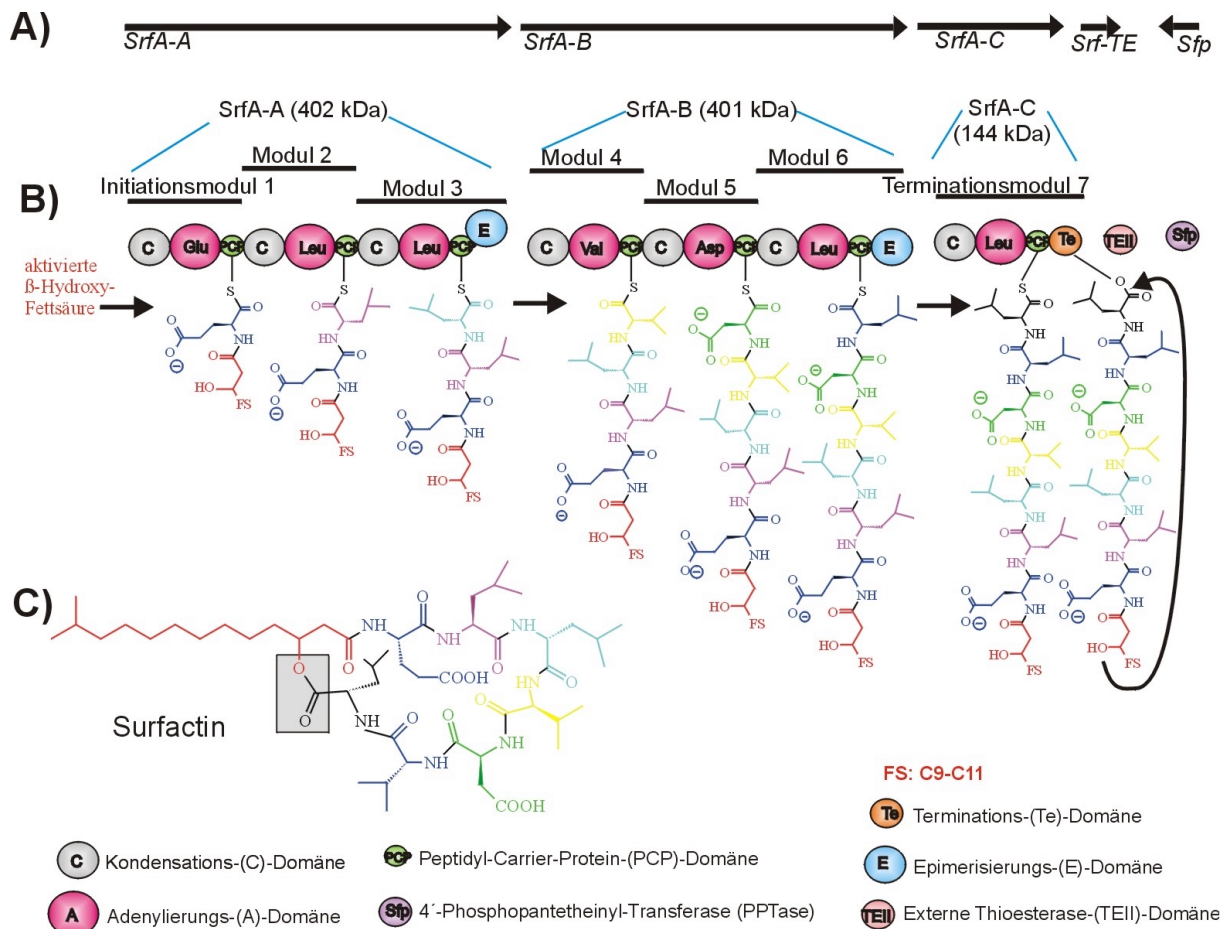


Abb. 2.3: Darstellung der Biosynthese des Surfactins. Der Peptidanteil des Heptalipopeptids Surfactin wird von sieben NRPS-Modulen synthetisiert, die auf drei NRPS verteilt sind. Die Synthese wird durch Übertragung einer aktivierten β -Hydroxy-Fettsäure auf das Initiationsmodul gestartet; die wachsende Peptidkette durchläuft 6 Elongationszyklen bis das lineare Lipoheptapeptid schließlich als Thioester an das PCP des Terminationsmoduls SrfA-C gebunden ist. Anschließend wird das lineare Lipoheptapeptid auf einen konservierten Serinrest der Te von SrfA-C übertragen. Durch den nukleophilen Angriff der β -Hydroxy-Gruppe der inkorporierten Fettsäure auf die C-Terminale Carboxyl-Gruppe des L-Leu auf Position 7 kommt es zur Lactonisierung des Lipoheptapeptides. Die Proteine Sfp und TEII sind für die Synthese mitverantwortlich. Sfp katalysiert dabei die Umwandlung der inaktiven apo-NRPS zur aktiven holo-NRPS. Die TEII fungiert als sog. Regenerierungsenzym, das falsch beladene holo-PCP wird dadurch zu einsatzbarem holo-PCP modifiziert.

2.3. Die Funktionen der einzelnen Domänen

Ein Modul wird in Domänen unterteilt, jede Domäne besitzt eine distinkte enzymatische Funktion, die die einzelnen Schritte der nichtribosomalen Peptidsynthese katalysiert (Stachelhaus and Marahiel, 1995a). Für die Erkennung und Aktivierung des Substrates (der AS), den Transport zu den jeweiligen katalytischen Zentren und die Verknüpfung der AS mit der AS des folgende Moduls (siehe Abb. 2.4), sind die Adenylierungs-(A)-Domäne, das „Peptidyl-Carrier-Protein“ (PCP) und die Kondensations-(C)-Domäne verantwortlich.

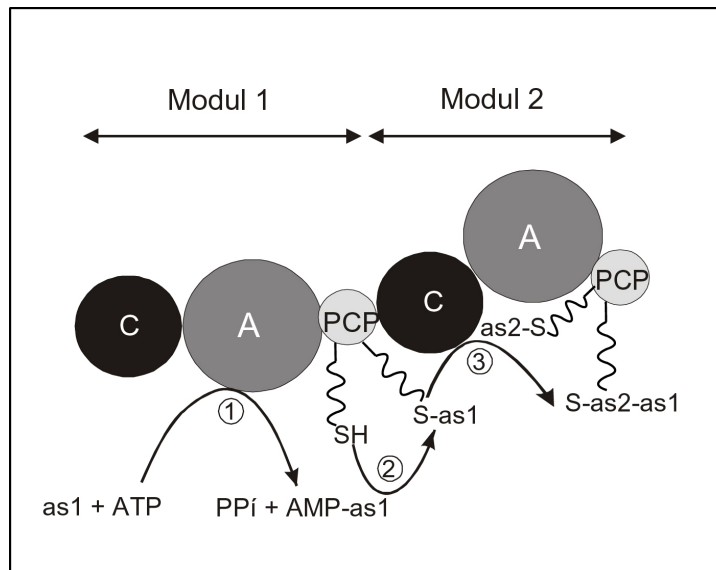


Abb. 2.4: Aufbau und Reaktionsabfolge in einem NRPS-Modul. Ein Modul beinhaltet eine C-, A-, und PCP-Domäne. (1) Die A-Domäne erkennt die Substrat-Aminosäure und aktiviert sie zum Aminoacyladenylat. (2) Die aktivierte Aminosäure wird kovalent als Aminoacyl-S-Pant-PCP auf dem 4'-Pant der PCP-Domäne gebunden. (3) Die folgende Translokation des Aminoacyl (as1)-S-Pant-Restes durch die C-Domäne des nachfolgenden Moduls führt dann durch die Ausbildung einer Peptidbindung zum Produktpeptid.

Auf Primärstrukturebene kann man durch Sequenzvergleich einzelner Domänen hochkonservierte Motive erkennen (Marahiel *et al.*, 1997b), die sog. Core-Motive (siehe Anhang Tabelle 8.1.1). In manchen Fällen (wie bei den A-, PCP- und Te-Domänen) konnte der Einfluss einiger Core-Motive an der Funktion durch biochemischen oder strukturelle Untersuchungen belegt werden (Conti *et al.*, 1997; May *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die biochemischen Funktionen und strukturellen Besonderheiten der Domänen werden im folgenden im Detail besprochen.

2.3.1. Die Adenylierungs-(A)-Domäne

Die Selektion der Substrataminosäure in den Produkten der NRPS wird in der ersten Line durch die A-Domäne bestimmt. Die ca. 550 Aa großen Domänen aktivieren ihre Substrataminosäure unter ATP-Hydrolyse zum entsprechenden Aminoacyladenylat (Dieckmann *et al.*, 1995; Turgay *et al.*, 1992) (siehe Abb. 2.5).

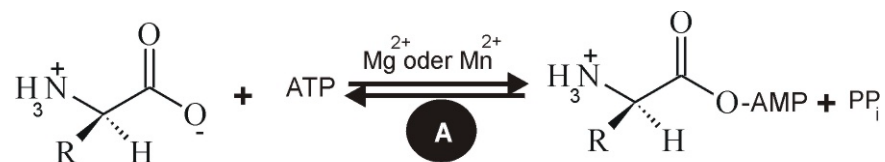


Abb. 2.5: Die A-Domäne. Die A-Domäne katalysiert die Bildung des Aminoacyladenylats unter Hydrolyse von ATP. Die Reaktion benötigt Mg-Ionen.

Die A-Domäne gehört zur Superfamilie der adenylylbildenden Enzyme, der auch die Luciferasen, Acyl-CoA-Ligasen, 4-Coumarat-Ligasen und die Chlorobenzoat-Ligasen angehören. Die Aktivierung von Aminosäuren als Aminoacyladenylat wird bei der

ribosomalen Synthese von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen I und II (aaRS) katalysiert (Eriani *et al.*, 1990). Die aaRS zeigen jedoch auf Primärstrukturebene noch in ihrer dreidimensionalen Struktur Homologie zur Superfamilie der adenylatbildenden Enzyme oder den A-Domänen der NRPS (Conti *et al.*, 1997).

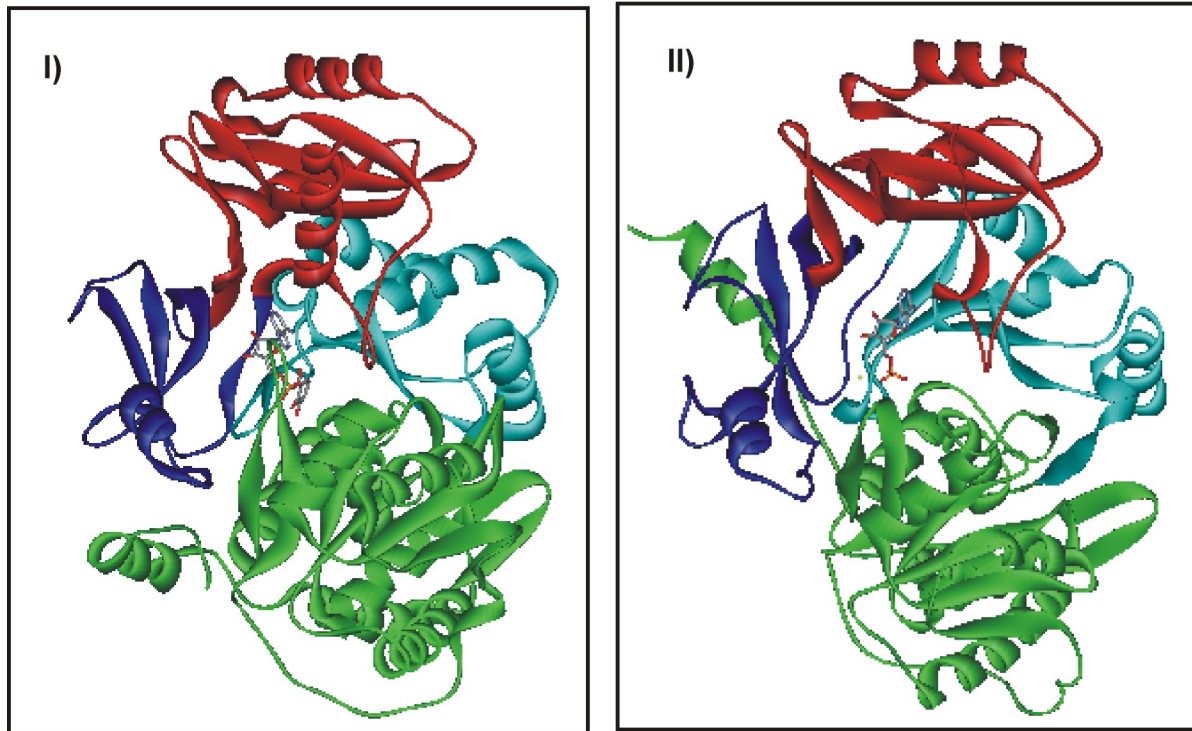


Abbildung 2.6: Ribbon-Darstellung der zwei bekannten Strukturen der A-Domänen. (I) Kristallstruktur von DhbE mit Dihydroxybenzoat und ATP aus *B. subtilis*, (II) GrsA (A) mit Phenylalanin und AMP aus *B. brevis*. Die A-Domänen werden in zwei Domänen N- und C-terminal (C-terminal Domäne ist rot dargestellt) unterteilt. Die N-terminale Domäne wird in drei Subdomänen unterteilt. Die Subdomänen sind grün, hell blau und dunkel blau gekennzeichnet (Conti *et al.*, 1997; May *et al.*, 2002).

Die kürzlich gelöste Kristallstruktur von DhbE (I) aus der Bacillibactin-Synthetase von *B. subtilis* zeigt die gleiche Topologie wie die beiden zuvor bekannten Kristallstrukturen der Luciferase aus *Photinus pyralis* und GrsA (siehe Abb. 2.6 II), die A-Domäne der Gramicidin S Synthetase A aus *B. brevis* (Conti *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 1997). Lediglich im Bereich der substratbindenden Tasche finden sich signifikante Unterschiede. Die Kristallstruktur der A-Domänen zeigt, dass diese Proteine aus zwei distinkten Untereinheiten bestehen, einer kleinen C- und einer großen N-terminalen Domänen (siehe Abb. 2-6). Die beiden Untereinheiten werden durch eine scharnierartige Struktur (*hinge*-Region) miteinander verbunden. Diese Faltungsart wurde zum erstenmal bei der Luciferase beschrieben und als „Hammer und Amboss“-Modell bezeichnet (Baldwin, 1996; Conti *et al.*, 1996). Der kompakte C-terminale Bereich wird als Deckeldomäne bezeichnet. Die C-terminale Deckeldomäne ist in der Luciferase jedoch um 94° im Vergleich zu den Strukturen von DhbE

und GrsA-A verdreht. Die Substratbindungstasche befindet sich an der Kontaktfläche zwischen der N- und C-terminalen Domäne (siehe Abb. 2.6).

Die Strukturaufklärung von DhbE mit den Substraten lässt eine dem aaRS-Katalysemechanismus ähnlichen Reaktionsmechanismus vermuten (May *et al.*, 2002).

Ebenso konnte die Beteiligung der Core-Motive an der Koordination der Substrate beobachtet werden. Eine Analyse aller Reste welche die AS koordinieren, führte zur Identifizierung von insgesamt nur 10 Resten, die für die Substratspezifität der A-Domäne verantwortlich sind und welche als „Codons“ der nichtribosomalen Peptidsynthese verstanden werden können (Stachelhaus *et al.*, 1999). Durch die gezielte Einführung von Mutationen in diesem sogenannten „nichtribosomalen Code“ gelang es Eppelmann und Mitarbeitern die Substratspezifität der A-Domäne zu verändern (Eppelmann *et al.*, 2002).

2.3.2. Die Carrier-Protein-(CP)-Domäne

Das Carrier-Protein (CP) ist eine weitere essentielle Domäne der NRPS. Das CP ist ein Modulbestandteil eines jedes NRPS Systems (siehe Abb. 2.4) und ist am C-Terminus der A-Domäne mittels eines Linkers (ca. 8 As) verbunden (Doekel and Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000a). Mit ca. 80 bis 100 As ist es die kleinste Domäne der NRPS. Die Aufgabe der CP ist es die zuvor aktivierte Substrataminosäure als Thioester zu binden und sie somit anderen katalytischen Zentren im NRPS-Modul zur Verfügung zu stellen (siehe Abb. 2.7). Die CP beinhalten einen hochkonservierten Serinrest im sog. Core T (Gocht and Marahiel, 1994; Schlumbohm *et al.*, 1991; Stachelhaus and Marahiel, 1995b). Die 4'-Phosphopanthetheinyl-Transferasen (PPTase) übertragen auf die Seitenkette dieses Serinrestes den 4'-Ppant-Anteil von CoA (Lambalot *et al.*, 1996) und überführen damit das nichtfunktionsfähige apo-CP in das aktive holo-CP. Diese Reaktion wird im folgenden näher besprochen.

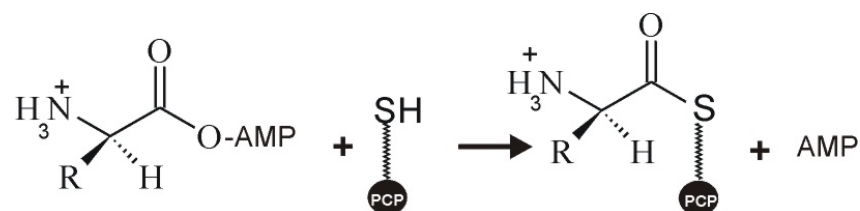


Abb. 2.7: Die holo-PCP-Domäne. Die holo-PCP-Domäne bindet das aktivierte Aminoacyladenylat als Thioester an die 20 Å lange, flexible prosthetische Gruppe 4'-Ppant.

Das CP gehört zur Superfamilie der Acyl-Carrier-Proteine. Die aminosäurebindenden CP nennt man Peptidyl-Carrier-Proteine (PCP), binden sie aromatische Carbonsäuren werden sie als Aryl-Carrier-Proteine (ArCP) bezeichnet. Acetat-, Propionat- oder

Malonsäurederivatbindende CP werden als Acyl-Carrier-Protein (ACP) bezeichnet. CP werden auch in anderen Systemen wie z.B. den Fettsäuresynthasen (FAS), den Polyketidsynthasen (PKS) und den NRPS mit dem 4'-Ppant modifiziert und so aktiviert. Wie in den NRPS werden auch in den FAS und PKS die posttranslationalen Modifikationen mit einer spezifischen PPTase durchgeführt (Lambalot *et al.*, 1996).

Neben der Funktion als Träger der Produktbausteine dient das CP zur gerichtete Prozessierung der Substratintermediate und damit zu einem definierten Produktaufbau (Cane and Walsh, 1999; Hopwood, 1997).

Die NMR-Strukturanalysen der ACPs aus *E. coli* (Holak *et al.*, 1988), *B. subtilis* (Xu *et al.*, 2001), *Streptomyces coelicolor* (Crump *et al.*, 1997) und TycC3-PCP aus *B. brevis* (Weber *et al.*, 2000) weisen darauf hin, dass die Mitglieder der CP-Familie aus einem vier-Helix-Bündel besteht und der hochkonservierte Serinrest im Core T vor der Helix 2 lokalisiert ist (siehe Abb. 2.8).

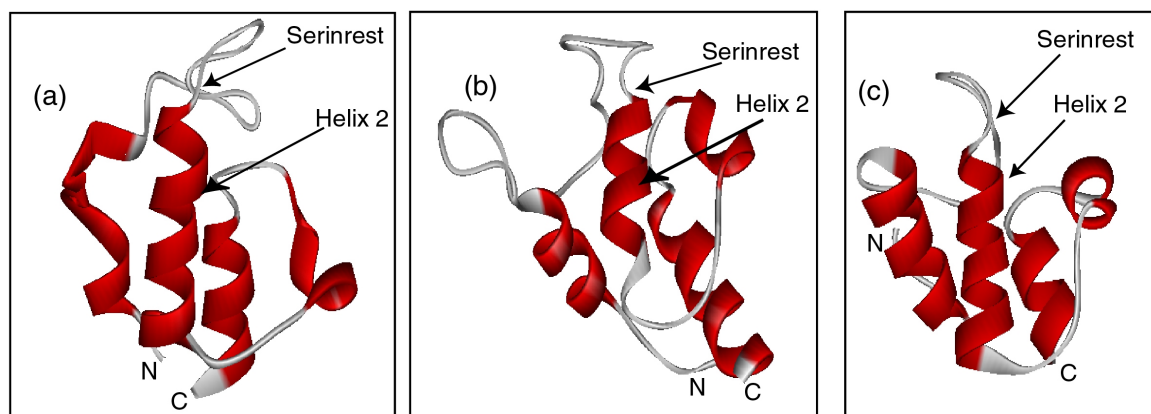


Abb. 2.8: Ribbon-Darstellung von einigen CPs. (a) ACP der FAS *E. coli* (b) ACP aus der Actinorhodin-Synthetase von *Streptomyces coelicolor* und (c) TycC3-PCP aus der Tyrocidin-Synthetase *B. brevis*. Alle diese CPs bestehen aus einem vier-Helix-Bündel. Die Position der Helix 2, des hochkonservierten Serinrestes in Core T, N- und C-Terminus sind in allen drei CP gekennzeichnet.

ACPs und PCPs haben eine ähnliche biologische Funktion und Sekundärstruktur. Der Sequenzvergleich zwischen ACPs und PCPs zeigen jedoch nur eine geringe Homologie auf Primärstrukturebene (siehe Anhang Tabelle 8.7, ca. 7-20 % Identität). Der größte homologe Bereich liegt um den invarianten Serinrest. Im Gegensatz dazu ist die Sequenzhomologie zwischen ACPs von FAS und PKS (TypII) sehr groß (ca. 40-60 % Identität). Vergleicht man die PCPs miteinander (ca. 35-55% Identität), findet man die größten Übereinstimmungen im Bereich der Helix 1 und der Schleife zwischen Helix 1 und 2. Bei den PCP konnte ein Zusammenhang zwischen der Lokalisierung innerhalb des NRPS Moduls und der AS-Sequenz im Core-Motiv T festgestellt werden und die PCP in zwei Gruppen geteilt werden. Dabei stellen die PCP^E (N-terminal von E-Domänen gelegen) sowie die PCP^C (N-terminal

von C-Domänen gelegen) jeweils eine eigene Gruppe dar (Gehring, 1998; Linne *et al.*, 2001). Der größte Unterschied zwischen diesen zwei PCP-gruppen findet sich in der Schleife zwischen Helix 1 und 2 und in der Helix 4. Die AS-Sequenz des Core T ist bei PCP^E GGDSIKA(L/I) und bei PCP^C GGHSLKA. Die Helix 2 von PCP^E beinhaltet drei positiv geladene Aminosäuren, während PCP^C nur zwei enthält (siehe Abb. 2.9). Die Aminosäure Gln in Position 50 ist bei PCP^E konserviert. Außerdem fehlt bei PCP^E ein Glutamat an der Position 58 (nummeriert nach der NMR-Struktur von TycC3-PCP) (Weber *et al.*, 2000).

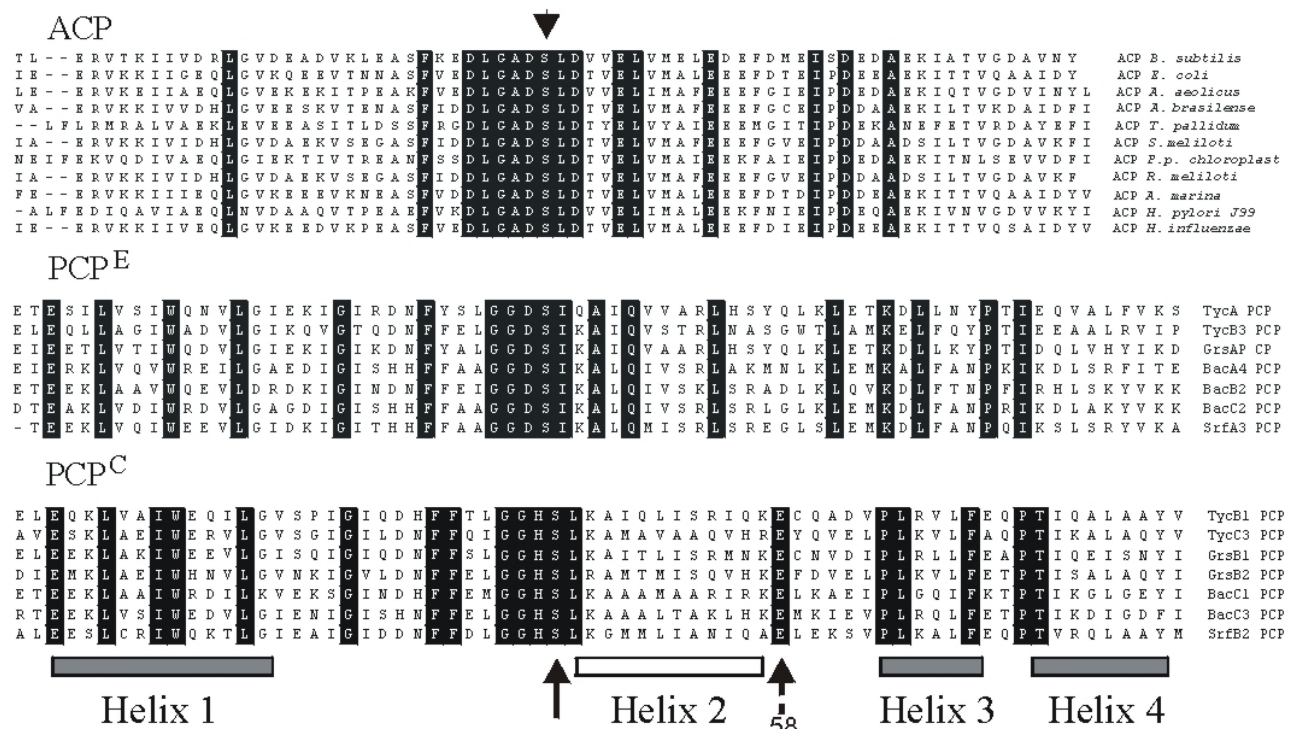


Abb. 2.9: Sequenzvergleich der Acyl-carrier-Protein Superfamilie. Dargestellt sind die Sequenzen verschiedener ACP aus FAS, PCP^E und PCP^C aus NRPS. Die hochkonservierten Reste sind durch schwarze Boxen markiert. Die vier Boxen unterhalb des Sequenzvergleichs symbolisieren die vier Helices. Die weiße Box repräsentiert Helix 2 von PCP, in der später Mutationen durchgeführt wurden. Der invariante Serinrest (schwarzer Pfeil) ist vor der Helix 2 in den PCP und ACP lokalisiert. Der gestrichelte Pfeil in Position 58 weist auf die Abwesenheit von Glu(E) in PCP^E hin (Weber *et al.*, 2000). Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MegAlign 5.0 DNASTAR durchgeführt, dabei wurde ClustalW als Methode verwendet. Die Sequenzen bei ACP stammen der Reihenfolge nach aus: *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Aquifex aeolicus*, *Azospirillum brasilense*, *Treponema pallidum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Psychotria psychotrioides chloroplast*, *Rhizobium meliloti*, *Avicennia marina*, *Helicobacter pylori* J99 und *Haemophilus influenzae*. Bei PCP^E und PCP^C sind TycA, TycB und TycC aus der Tyrocidin-Synthetase von *B. brevis*, GrsA und GrsB aus der Gramacidin-Synthetase S von *B. brevis*, BacA, BacB und BacC aus der Bacitracin-Synthetase aus der *B. licheniformis* und SrfA und SrfB aus der Surfactin-Synthetase aus *B. subtilis*. Die prozentuellen Sequenzidentität ist im Anhang 8.5 dargestellt.

Fast in jeder NRPS ist eine PCP^{Te} N-terminal der Te-Domäne lokalisiert. Die PCP^{Te} haben die gleiche Sequenz im Core T wie die PCP^C und unterscheiden sich kaum von den PCP^C und bilden daher auch keine eigene Gruppe (siehe Abb. 2.10).

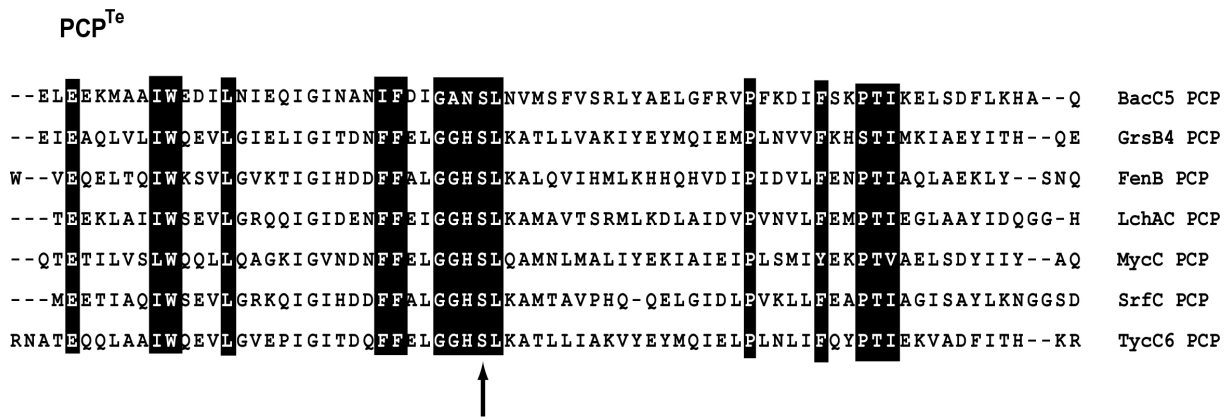


Abb. 2.10: Sequenzvergleich verschiedener PCP^{Te}. Die hochkonservierten Reste sind mit schwarzen Boxen markiert. Der invariante Serinrest (schwarzer Pfeil) befindet sich vor der Helix 2. Die Sequenzen bei PCP^{Te} stammen Reihenfolge nach aus: Bacitracin-Synthetase, Gramicidin-Synthetase, Fengicin-Synthetase, Lichensyn-Synthetase, Mycosubtilin-Synthetase, Surfactin-Synthetase und Tyrocidin-Synthetase. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MegAlign 5.0 DNASTAR durchgeführt, dabei wurde die ClustalW Methode verwendet.

Die Funktion der CPs ist der Transport des aktivierten Substrats zu anderen katalytischen Zentren in den NRPS-Modulen. Bei den holo-PCP können je nach Beladungszustand des 4'-Ppant-Kofaktors unterschiedliche Affinitäten zu den unterschiedlichen Domänen der NRPS gefunden werden. Im unbeladenem holo-Zustand ist die Affinität zur A-Domäne am größten, mit dem am 4'-Ppant gebundenen und aktivierten Substrat dagegen zeigen die PCP grösste Affinität zur C-Domäne (siehe Abb. 2.11). Bei der Orientierung des gebundenen Substrats am PCP muss diese bei der C-Domäne zwischen der Donor- und Akzeptor-Stelle unterscheiden (siehe 2.3.3). Das unterschiedliche Bindungsverhalten der PCP führt dazu, dass das aktivierte Substrat von einer Domäne zur nächsten Domäne weitergegeben wird und dadurch das Produkt gebildet wird (Luo L. *et al.*, 2002; Luo and Walsh, 2001).

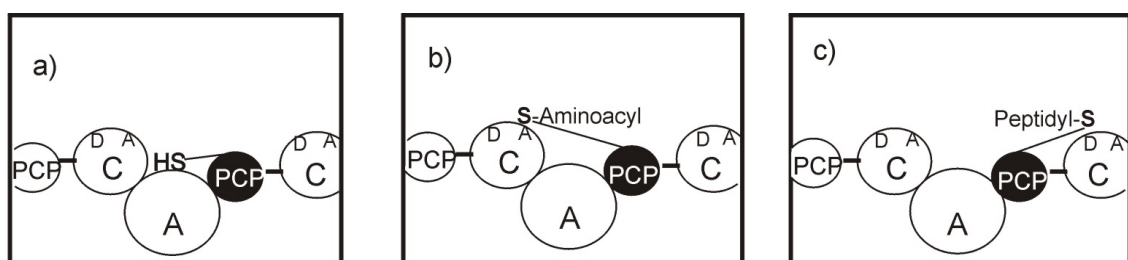


Abb. 2.11: Die 4'-Ppant-Kofaktor Positionen des PCP. Der 4'-Ppant-Arm des PCP kann je nach Beladungszustand unterschiedliche Neigungen zu den Domänen haben und dadurch unterschiedliche Positionen einnehmen. (a) Im unbeladenem Zustand des 4'-Ppant ist die Affinität zur A-Domäne des gleichen Moduls am größten; (b) mit Aminoacyl-beladenes 4'-Ppant bleibt bis zur Peptidknüpfung in der Akzeptor-(A)-Stelle der C-Domäne des gleichen Moduls, und (c) nach Peptidbindungsknüpfung positioniert sich dann der 4'-Ppant in der Donorstelle der folgenden C-Domäne.

2.3.3. Die Kondensations-(C)-Domäne

Die Kondensation-(C)-Domäne katalysiert die Knüpfung der Peptidbindung in der nichtribosomalen Peptidsynthese (siehe Abb. 2.12) und gehört damit zusammen mit A- und PCP-Domäne zu den unerlässlichen Domänen in einem Modul (siehe Abb. 4). Die C-Domäne ist am N-Terminus der A-Domäne lokalisiert und ist mittels eines Linkers (ca. 13 As) mit der A-Domäne verbunden (Mootz *et al.*, 2000a).

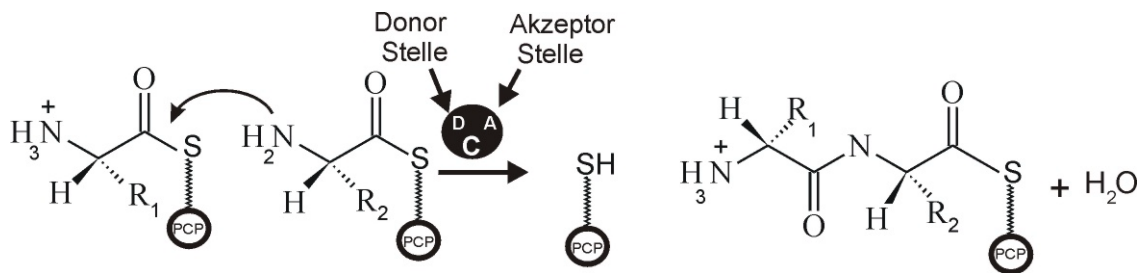


Abb. 2.12: Die Reaktion der C-Domäne. Die C-Domäne katalysiert die Peptidknüpfung zwischen zwei als Thioester gebundenen Aminosäuren. Die Bindung wird zwischen der Carboxygruppe der ersten und der freien Aminogruppe der zweiten Aminosäure gebildet. Bei der C-Domäne sind Donor-(D)-Stelle und Akzeptor-(A)-Stelle gekennzeichnet.

Neueste biochemische Untersuchungen der C-Domäne zeigten, dass in NRPS Systemen neben der A-Domäne auch die C-Domänen eine Substratspezifität besitzen. Dabei kann für die C-Domäne in eine Donor- und eine Akzeptor-Stelle unterschieden werden (siehe Abb. 2.12) (Belshaw *et al.*, 1999; Stachelhaus *et al.*, 1998). An der Donor-Stelle bindet das Aminoacyl-S-Ppant-PCP (nur bei dem ersten Modul) bzw. das Peptidyl-S-Ppant-PCP des vorherigen Moduls. An der Akzeptor-Stelle bindet das folgende Aminoacyl-S-Ppant-PCP. Dabei dient der Stickstoff des Aminoacyl restes in der Akzeptor-Stelle als Nukleophil bei der Kondensationsreaktion (siehe Abb. 2.12).

Die Untersuchungen zur Spezifität der C-Domäne wurden mit Hilfe künstlicher Fehlbeladungen durchgeführt. Als Substrate wurden dabei AS-CoA Derivate verwendet, die mittels Sfp auf das PCP übertragen wurden. Im Ergebnis zeigte sich, dass die sog. Akzeptor-Stelle eine restriktive Stereoselektivität und eine deutliche Selektivität in Bezug auf die Größe der Substrate zeigte. Für die Donor-Stelle konnte dagegen nur eine geringe Substratspezifität beobachtet werden (Belshaw *et al.*, 1999).

Die 450 As große C-Domäne beinhaltet das hochkonservierte sogenannte His-Motiv (Core 3: HHXXXDG). Das His-Motiv kommt auch bei den Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT) und Dihydroliponamid-Acetyltransferasen (E2p) (de Crécy-Lagard *et al.*, 1995; Healy *et al.*, 1998; Leslie, 1990) vor. Die gelöste Kristallstruktur von VibH aus der Vibriobactin-

Synthetase (*Vibrio cholerae*) zeigt, dass das monomere VibH die gleiche Struktur aufweist wie das monomere CAT und E2p (Keating *et al.*, 2002). VibH wird in eine N-terminale (150 As) und eine C-terminale (220As) Domäne unterteilt, welche mit einem 56 As langen helicalen Linker miteinander verbunden sind (siehe Abb. 2.13).

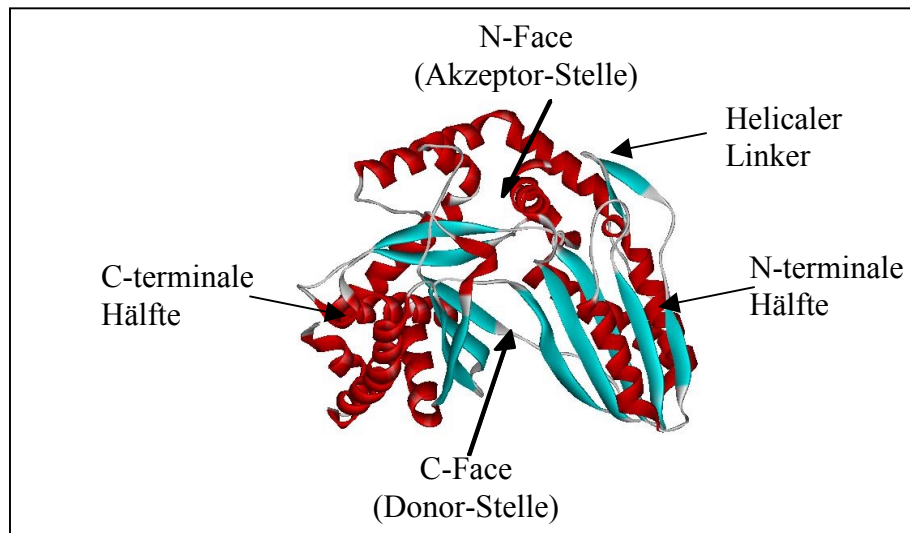


Abb. 2.13: Ribbon-Darstellung von VibH. VibH aus der Vibriobactin-Synthetase gehört zur Enzymklasse der Amid-Synthasen. Die N- und C-terminalen Domänen werden von einem 56 As großen helicalen Linker miteinander verbunden. Jede dieser Domänen beinhaltet eine $\alpha\beta\alpha$ Sandwich-Struktur (Keating *et al.*, 2002).

Die Struktur von VibH wurde ohne Substrat gelöst, was eine genaue Identifizierung des katalytischen Zentrums erschwert. Durch Strukturvergleiche mit der CAT (mit CoA als Substrat), konnte bei VibH das so genannte „C-Face“ und „N-Face“ des Proteins, welche die putativen Bindungsstellen für das Dihydroxybenzoyl-ArCP (elektrophiler Partner) und das Norspermidin-Nukleophil (nukleophiler Partner) darstellen, identifiziert werden. Ein Solventkanal verbindet N- und C-Face des VibH. Die Beteiligung des His-Motivs an der Katalyse konnte ebenfalls anhand dieser Strukturdatenvergleiche erfolgen (Keating *et al.*, 2002). Aus den Strukturdaten ergibt sich die Vermutung, dass das C-Face die elektrophile Donor-Stelle und das N-Face die nukleophile Akzeptor-Stelle repräsentiert (Keating *et al.*, 2002; Schwarzer, 2002).

2.3.4. Die Terminations-(Te)-Domäne

Ein Modul besteht normalerweise aus den drei angesprochenen essentiellen Domänen, C-, A- und PCP. Terminationsmodule dagegen besitzen in allen bisher bekannten bakteriellen NRPS noch eine weitere, vierte Domäne, die für die Abspaltung des fertigen Produktes

verantwortlich ist. Dies konnte in früheren Deletionsexperimenten der Te-Domäne, der Surfactin-Synthetase gezeigt werden, die zu einem fast vollständigen Stillstand der Peptidsynthese führten (Cosmina *et al.*, 1993). Ebenso führte eine Translokation der Te-Domäne in der Surfactin-Synthetase zur frühzeitigen Terminierung der Peptidsynthese und somit zu verkürzten Lipopeptiden (de Ferra *et al.*, 1997).

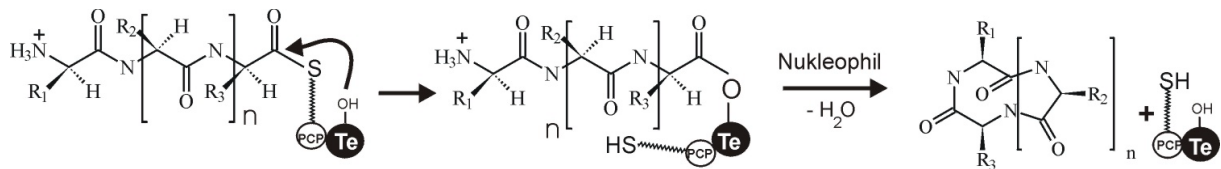
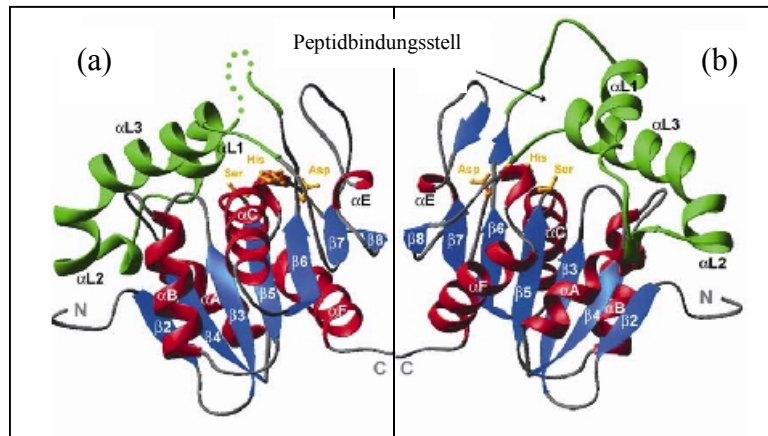


Abb. 2.14: Die Reaktion der Te-Domäne. Die Te-Domäne katalysiert die Abspaltung des fertigen Produktes. Durch den nukleophilen Angriff der Hydroxy-Gruppe des Serinrestes der Te-Domäne auf die Carboxy-Gruppe der als Thioester am PCP gebundenen Peptidkette findet eine Transacylierung statt und das lineare Peptid wird kovalent an einen hochkonservierten Serinrest der Te-Domäne als Peptidyl-O-Te gebunden. Die Abspaltung des Produktes erfolgt anschließend durch internen nukleophilen Angriff.

Sequenzvergleiche der ca. 250 As großen Te-Domäne mit der Fettsäure-Acyl-Thioesterase Typ I zeigte, dass diese Proteine zur Familie der Serinprotease gehören. Die kürzlich gelöste Kristallstruktur der Te-Domäne der Surfactin-Synthetase zeigt die Zugehörigkeit zu der Superfamilie der α/β -Hydrolasen (Bruner *et al.*, 2002). Die Lösung der Kristallstruktur und die biochemische Analysen der Te-Domäne weisen auf eine katalytische Triade mit Ser80, His207 und Asp107 in der katalytischen Tasche hin, dies wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt (Tsai *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2002). Durch den nukleophilen Angriff der Hydroxy-Gruppe des Serinrestes an die Carboxy-Gruppe des gebundenen Produkts am 4'-Ppant findet eine Transacylierung statt (siehe Abb. 2.14). Dabei bindet das lineare Peptid kovalent an den Serinrest (Peptidyl-O-Te) (Keating *et al.*, 2001). Die Deacylierung bzw. Makrozyklisierung wird durch den Angriff eines peptidketteninternen Nukleophils durchgeführt. Dabei fungiert der Histidinrest als aktivierender Rest des Nukleophils und ist damit essentieller Bestandteil der katalytischen Triade (Tsai *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2002).

Die Kristallstruktur der Te-Domäne zeigte zwei verschiedene Konformationen, die offene (O) und die geschlossene (C) Konformation. Der Unterschied der beiden Konformationen ist die Umpositionierung eines Bereichs von ca. 70 As, der aus einem β -Faltblatt und drei α -Helices besteht (siehe Abb. 2.14 und 2.15) (Bruner *et al.*, 2002).



Ab. 2.15: Ribbon-Darstellung der Te-Domäne der Surfactin-Synthetase. (a) Geschlossene (C)-Form. (b) Offene (O)-Form der Te-Domäne. Der grüne Bereich von 70 As repräsentiert den Bereich, der der Umpositionierung unterworfen ist (Bruner *et al.*, 2002).

2.3.5. Optionale Modifikationsdomänen

Unter optionalen Domänen versteht man modifizierende Domänen, die bedeutend zur strukturellen Vielfalt der nichtribosomal synthetisierten Peptide beitragen. Die Epimerisierungs-(E)-Domäne, N-Methylierungs-(M)-Domäne, N-Formylierungs-(F)-Domäne und Oxidations-(Ox)-Domäne sind Beispiele für optionale Domänen (Mootz *et al.*, 2002b; Walsh *et al.*, 2001). Alle diese Modifizierungen finden an den als Thioester gebundenen Substraten statt (Walsh *et al.*, 2001). Hier wird nur die E-Domäne kurz besprochen.

2.3.5.1. Epimerisierungs-(E)-Domäne

Die ca. 450 As großen E-Domänen sind Racemasen und katalysieren die Umwandlung einer L- zur D-As und umgekehrt in den NRPS (siehe Abb. 2.16) (Stachelhaus and Walsh, 2000). E-Domänen werden nach ihrer Lokalisation innerhalb der NRPS in Aminoacyl-E-Domänen (am C-Terminus der Initiationsmodule wie bei TycA) und Peptidyl-E-Domänen (in Elongationsmodulen) eingeteilt (Shiau *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1995). Die E-Domäne weist keine Sequenzhomologie zu bekannte Racemasen auf, vielmehr hat sie Homologien zu den C-Domänen, da auch hier das hochkonservierte His-Motiv beobachtet wird (Stachelhaus *et al.*, 1998). Biochemische Untersuchungen in GrsA haben für die E-Domäne eine Substrattoleranz gezeigt, die es der E-Domäne erlaubt zusätzlich zu deren natürlichen Substrat L-Phe-S-Ppant-PCP^E auch die L-As L-Ala oder L-Leu zur jeweiligen D-Form umzuwandeln (Belshaw *et al.*, 1999; Linne and Marahiel, 2000).

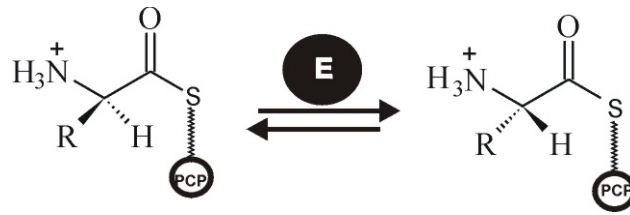


Abb. 2.16: Die Reaktion der E-Domäne. Die E-Domäne katalysiert die Umwandlung von L-As, die als Thioester an 4'-Ppant des PCPs gebunden sind, zur D-Form und umgekehrt.

2.4. Posttranslationale Modifikation durch 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen)

Die Übertragung der prosthetischen Gruppe auf das CP wird durch die sogenannte 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) durchgeführt (Lambalot *et al.*, 1996). Das CP ist ohne diese Modifikation nicht in der Lage den Transport der aktivierten Substrate zu anderen katalytischen Zentren in NRPS-Modulen zu erfüllen (Borchert *et al.*, 1994; Marahiel, 1992b). Frühere Untersuchungen an *B. subtilis* JH642 zeigten, dass trotz intakter Surfactin-Synthetase in diesem Stamm kein Surfactin produziert wird, da dieser Stamm ein nicht funktionales, verkürztes Sfp (165 As) enthält. Erst durch eine *in trans*-Komplementation mit einem intakten Sfp (224 As) konnte die Synthese des Heptalipopeptid Surfactin in Gang gesetzt werden. (Nakano *et al.*, 1992). Die Untersuchungen von Gocht und Stein zeigten, dass an jedem NRPS Modul ein 4'-Ppant kovalent gebunden wird (Gocht and Marahiel, 1994; Stein *et al.*, 1994).

Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTase) übertragen den 4'-Phosphopantethein-Rest (4'-Ppant) von CoA auf die Hydroxylgruppe eines hochkonservierten Serinrestes im Core T des CP unter Abspaltung von 3',5'-ADP (siehe Abb. 2.17a) (Lambalot *et al.*, 1996). Diese Reaktion wird als Priming-Reaktion bezeichnet. In der Priming-Reaktion katalysiert die PPTasen den nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serinrestes des CP auf das 5'-β-Pyrophosphat des CoA. Dadurch werden inaktive apo-CP zu aktiven holo-CP umgewandelt (Marahiel *et al.*, 1997b; Quadri *et al.*, 1998b).

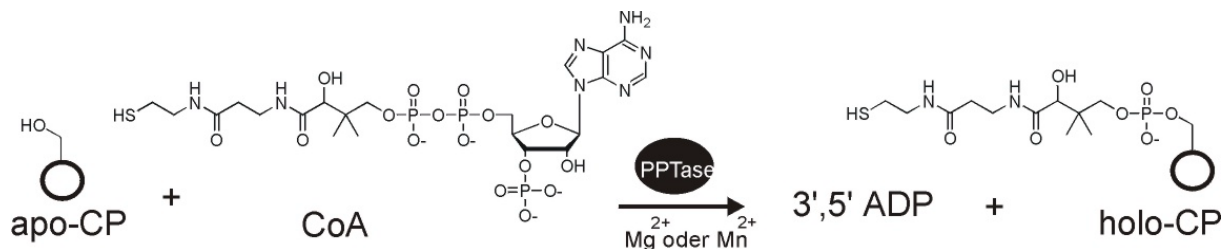


Abb. 2.17a: Die Priming-Reaktion.

Studien mit verschiedenen CoA-Derivaten als Substrate für PPTasen zeigten, dass neben CoA auch Acetyl-CoA, Homocysteamin-CoA, Desulfo-CoA und Acetonyldethio-CoA (siehe Abb.

2.17b) akzeptiert werden und damit die apo-CP zur holo-Form überführt werden. 3'-Dephospho-CoA hingegen wurde als Substrat nicht akzeptiert (Gehring *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1998c).

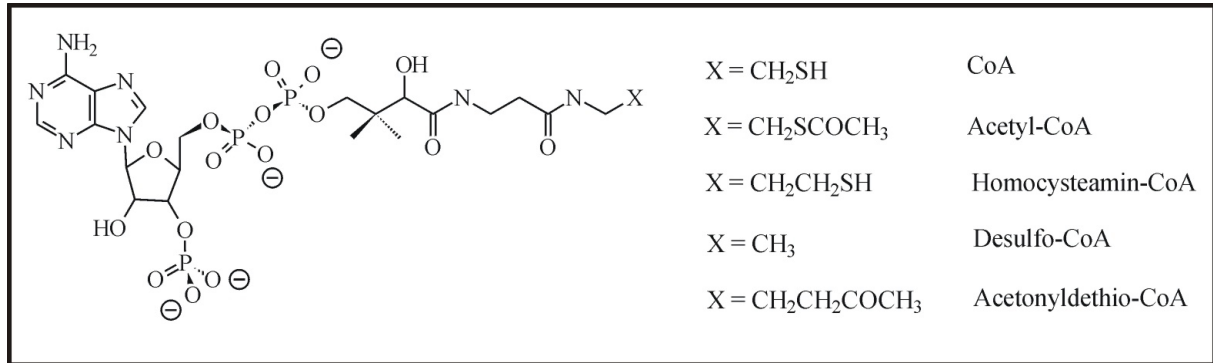


Abb. 2.17b: Die Struktur von CoA-Derivaten.

Die Strategie der Verwendung von CP mit kovalent gebundenen 4'-Ppant als Kofaktor für die gerichtete Prozessierung der Edukte und Intermediate in Multienzymkomplexen findet man neben NRPS auch bei den Fettsäuresynthasen (FAS) und den Polyketidsynthasen (PKS) (Cane and Walsh, 1999; Hopwood, 1997; Kleinkauf, 2000; Walsh *et al.*, 1997). Bei PKS und FAS spielt das Acyl-Carrier-Protein (ACP) die gleiche Rolle wie das PCP in der NRPS (Katz, 1997; Khosla, 1997). Dabei werden Acetateinheiten mittels der FAS und bei den PKS werden Acetat- bzw. Propionat-Einheiten miteinander verknüpft. Die NRPS, PKS und FAS sind die prominentesten Beispiele für Biosynthesysteme für diese Strategie in bakteriellen und pilzlichen Systemen. Ein weiteres Beispiel für eine ähnliche Biosynthesestrategie stellt das an der Lysinbiosynthese beteiligte Lys5/Lys2 dar, Lys5 ist die PPTase und Lys2 besteht aus A-, PCP- und Reduktase-Domäne (Ehmann *et al.*, 1999). Dieses System wurde in fast allen Eukaryonten von Hefe bis zum Menschen beobachtet (Mootz *et al.*, 2002a; Praphanphoj *et al.*, 2001). Weitere spezielle Varianten sind die D-Alanyl-Carrier-Protein (DCP) aus *Lactobacillus caesei* und *Bacillus subtilis*, die für die Inkorporation von D-Alanin in die bakterielle Zellwand von Gram-positiven Bakterien involviert sind (Heaton and Neuhaus, 1992; Perego *et al.*, 1995), NodF aus *Rizobium leguminosarum*, das sich an der Biosynthese spezieller Fettsäuren für die Initialisierung der Pflanzenzellinfektion beteiligt (Ritsema *et al.*, 1994).

Die PPTasen sind häufig, aber nicht immer, assoziiert mit den zu modifizierenden Proteinen. Beispiele hierfür sind das Sfp-Gen aus *B. subtilis*, das ca. 4 kbp stromabwärts von Gen der Surfactin-Synthetase lokalisiert ist oder das MtaA, das direkt mit der Myxothiazol-Synthetase

assoziiert ist (Silakowski *et al.*, 1999) (siehe Abb. 2.2) sowie die integrale PPTase von FAS2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

Die PPTasen bilden eine Superfamilie, die anhand ihrer Sequenz und Substratspezifität in drei Klassen unterteilt wird (Abb. 2.18) (Mootz *et al.*, 2002a):

Die erste Klasse bilden die PPTasen des AcpS-Typs. Sie sind basische Enzyme, ca. 120 As groß und scheinen als eigenständige Proteine vorzuliegen. AcpS-Typ PPTasen wurden in fast allen Mikroorganismen gefunden und sind für die Modifikation von den ACP der FAS verantwortlich. Der prominenteste Vertreter ist das AcpS aus *E. coli* und *B. subtilis* (Lambalot and Walsh, 1996; Mootz *et al.*, 2001). Die biochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass AcpS zusätzlich zu den ACP aus FAS, die ACP der TypII PKS und die DCP aus *Lactobacillus caesei* erkennen und modifizieren können (Mootz *et al.*, 2001). Die biochemischen sowie die Struktur-Untersuchungen zeigten, dass die PPTasen dieser Klasse als Homotrimer arbeiten (Parris *et al.*, 2000).

Die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis* repräsentiert den Prototyp der zweiten Klasse (Mofid *et al.*, 2002; Reuter *et al.*, 1999). Die Enzyme aus dieser Klasse sind ca. 240 As groß. Zu dieser Klasse gehören z.B. die PPTasen Gsp (*B. brevis*) (Gocht and Marahiel, 1994), Bli (*B. lichienformis*) (Marahiel *et al.*, 1997b; Neumuller *et al.*, 2001), EntD (*E. coli*) (Lambalot *et al.*, 1996), VibD (*Vibrio cholerae*) (Wyckoff *et al.*, 1997) MtaA (*Stigmatella auranticaca*) (Silakowski *et al.*, 1999) und Lys5 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Ehmann *et al.*, 1999; Lambalot *et al.*, 1996). Die PPTasen dieser Klasse können sowohl PCP wie ArCP modifizieren. Die biochemischen Untersuchungen und die *in vivo* Komplementationen, die mit Sfp und Gsp durchgeführt wurden, zeigten die große Substrattoleranz der beiden Proteine und lassen damit diese Klasse als eine universelle PPTase für die im Sekundärmetabolismus verwendeten CP erscheinen. (Lambalot *et al.*, 1996; Mofid *et al.*, 1999; Mootz *et al.*, 2001). Die Lösung der Kristallstruktur sowie die biochemischen und chromatographischen Untersuchungen zeigten, dass die PPTasen des Sfp-Typs als Monomere aktiv sind (Mofid *et al.*, 1999; Reuter *et al.*, 1999).

Die dritte Klasse der PPTasen stellen die FAS2-Typ-PPTasen dar. Dieser PPTase-Typ wurde als integraler Bestandteil der Multienzymkomplexe der FAS von Eukaryoten im Zytoplasma gefunden wie z.B. das FAS2 von *Saccharomyces cerevisiae* (Fichtlscherer *et al.*, 2000; Lambalot *et al.*, 1996; Stuible *et al.*, 1997). Über die Substrattoleranz dieser Enzyme ist wenig bekannt. Die biochemischen Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass die PPTasen des FAS2-Typs ebenfalls als Monomer arbeiten (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

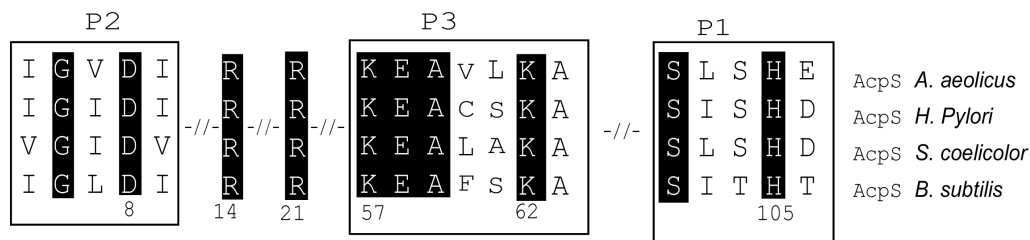
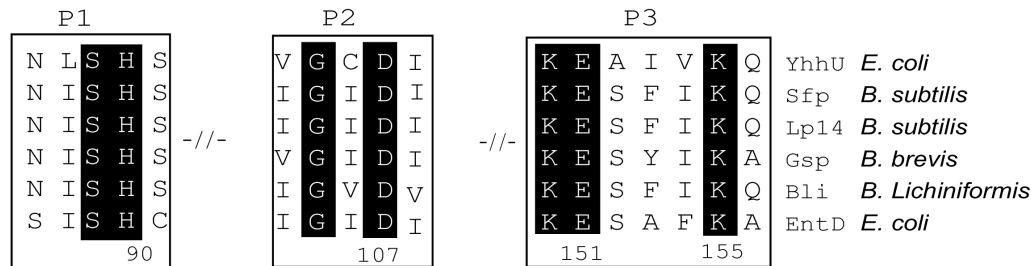
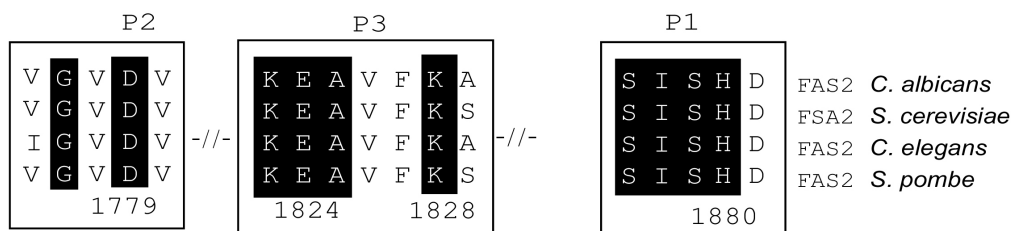
AcpS-Typ:**Sfp-Typ:****FAS2-Typ:**

Abb. 2.18: Sequenzvergleich der verschiedenen PPTasen-Klassen. PPTasen werden in drei Klassen unterteilt. Die erste Klasse stellen den AcpS-Typ, die zweite Klasse den Sfp-Typ und die dritte Klasse den FAS2-Typ dar. Die Boxen P1, P2 und P3 sind die Core-Motive der PPTasen, diese Core-Motive sind beinahe in allen PPTasen konserviert und sind an der CoA-Bindung beteiligt (siehe Diskussionsteil 6.1.1 und Anhang Tabelle 8.1.2). Die Nummern unterhalb der Sequenzen entsprechen der Nummerierung wie im Folgenden aufgeführt: im AcpS-Typ der von AcpS aus *B. subtilis*, im Sfp-Typ der von Sfp aus *B. subtilis* und im FAS2-Typ der von FAS aus *Saccharomyces cerevisiae*. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Reihenfolge der Core-Motive bei AcpS- und FAS2-Typ anders ist als bei den Sfp-Typ PPTasen. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MegAlign 5.0 DNASTAR durchgeführt, dabei wurde die ClustalW Methode verwendet.

Da die Substratspezifität bei PPTasen unterschiedlich restriktiv ist, wird in Organismen, die mehr als einen 4'-Ppant abhängigen Stoffwechselweg enthalten, entsprechend mehr als eine PPTase gefunden. Als Beispiele hierfür werden *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* kurz behandelt. In *E. coli* existieren drei PPTasen: AcpS modifiziert die ACP der FAS, EntD die PCP und ArCP des Enterobactin Biosynthesekomplexes und YhhU (O195) hat eine bisher unbekannte Funktion (Flugel *et al.*, 2000; Lambalot and Walsh, 1996). *E. coli* AcpS gehört zum AcpS-Typ und EntD und YhhU zu den Sfp-Typ PPTasen. Die *in vivo* und *in vitro* Versuche bei EntD und *in vitro* bei YhhU zeigen, dass EntD und YhhU spezifisch für PCP sind und nicht das ACP der FAS modifizieren (Flugel *et al.*, 2000; Lambalot and Walsh, 1996). Flugel und Mitarbeiter konnten ebenfalls zeigen, dass YhhU *in vivo* bei sehr hoher

Konzentration AcpS in *E. coli* komplementieren kann (Flugel *et al.*, 2000). *B. subtilis* enthält nur zwei PPTasen AcpS und Sfp. Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass AcpS das ACP der FAS und DCP von der apo- zur holo-Form modifizieren kann und dass die restlichen CP vermutlich von Sfp modifiziert werden (Mootz *et al.*, 2001). *B. subtilis* enthält neben dem ACP der FAS und DCP insgesamt 40 CP die in NRPS und PKS-Klustern organisiert sind. In *S. cerevisiae* wurden alle PPTase Typen gefunden. Die mitochondriale PPTase, Ppt2, die zum AcpS-Typ gehört, Lys5, die zum Sfp-Typ gehört und zuletzt die integrierte Domäne des Multienzymkomplexes FAS2 im Zytoplasma, die dem FAS2-Typ gehört. Aktuelle Untersuchungen von Finking und Mitarbeitern zeigten, dass in *Pseudomonas aeruginosa* nur eine PPTase (PcpS) des Sfp-Typs existiert und somit die Aufgabe der PPTasen des AcpS- und Sfp-Typs in diesem Organismus übernimmt (Finking *et al.*, 2002).

2.5. Die externe Thioesterase-(TEII)-Domäne

Die externe Thioesterase-(TEII)-Domäne findet man häufig assoziiert mit NRPS-Biosyntheseclustern von bakteriellen Synthetasen (de Ferra *et al.*, 1997; Marahiel *et al.*, 1997a). Sequenzvergleiche dieser ca. 250 As großen distinkten Proteine zeigen, dass diese Enzyme Homologien zu eukaryotischen Fettsäuresynthetasen (FAS) aufweisen (Schneider and Marahiel, 1998). Die Funktion dieser Enzyme war bis vor kurzem unbekannt. Biochemische Analysen von Schwarzer zeigten jedoch, dass diese Enzym eine Regenerationsfunktion erfüllen, um z.B. die PCPs, die mit Acetyl-CoA von Sfp falsch modifiziert wurden, vom Acetyl-Teil zu befreien (siehe Abb. 2.19) (Heathcote *et al.*, 2001; Schwarzer *et al.*, 2002). Da Sfp oder andere PPTasen wie z.B. AcpS, CoA oder CoA-Derivate als Substrat verwenden können und den 4'-Ppant-Anteil auf die CP übertragen (Gehring *et al.*, 1997), ist die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlmodifikation gegeben, die zu einer blockierten NRPS-Synthesemaschinerie führen würde. Da die CoA-Konzentration im Vergleich zur Acetyl-CoA Konzentration in *E. coli* mit 14% zu 80% vergleichsweise gering ist (Vallari *et al.*, 1987), ist eine Fehlmodifikation innerhalb der Synthetasen sogar wahrscheinlich. Fehlt die TEII, so konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung des Surfactin in *B. subtilis* drastisch gesunken ist, was das zuvor dargestellte Szenario bestätigt (Schneider and Marahiel, 1998). Mittels Sequenzvergleichen der TEII konnte auch hier eine Zugehörigkeit zu den α/β -Hydrolasen mit ihrem Triade-Katalysemechanismus zur Serin, Histidin und Aspartat angenommen werden (Schroeder, 2002; Schwarzer *et al.*, 2002).

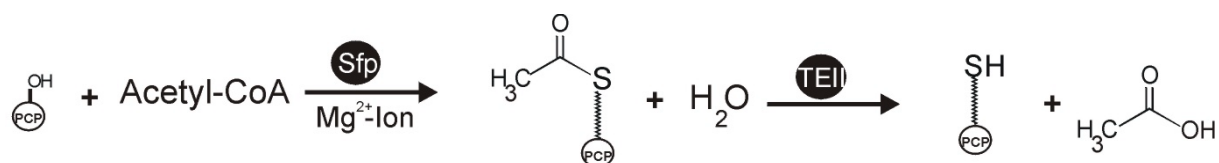


Abb. 2.19: Die externe Thioesterase-(TEII)-Domäne. Die TEII katalysiert die Hydrolyse von Resten, die falsch am 4'-Ppant-PCP beladen wurden. Als Beispiel ist hier gezeigt, dass apo-PCP mit Acetyl-4'-Ppant von Sfp zu holo-PCP modifiziert wurde, anschließend wird der Acetyl-Rest von der TEII hydrolysiert. Jetzt kann das PCP seine Funktion in NRPS erfüllen.

2.6. Die 4'-Ppant-Abhängigen Multienzymkomplexe

Die PKS und FAS gleichen in ihrem modularen Aufbau und ihrem Syntheschema sehr stark dem der NRPS (Cane and Walsh, 1999; Fichtlscherer *et al.*, 2000; Gokhale *et al.*, 1999; Khosla, 1997; Schweizer, 1996). Für die Protein-Protein Interaktion ist daher die quartäre Struktur all dieser Synthetasen vermutlich auf die anderer Systeme übertragbar. Deshalb soll zunächst anhand der schon bekannten Daten die Domänenorganisation dieser Synthasen beschrieben werden.

2.6.1. Domänen-Organisation in PKS und FAS

Die PKS sind wie die NRPS modular aufgebaut. Ein Modul besteht aus einer Acetyltransferase-(AT)-Domäne, dem Acyl-Carrier-Protein (ACP) und der Ketosynthase-(KS)-Domäne. Die AT-Domäne entspricht in ihrer Funktion der A-Domäne in den NRPS und überträgt Malonsäurederivate auf den 4'-Ppant des ACP (siehe Abb. 2.20)(Du *et al.*, 2001; Mootz *et al.*, 2002b).

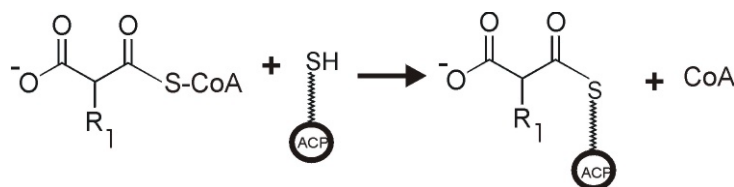


Abb. 2.20: Die Reaktion der Acetyltransferase-(AT)-Domäne. AT-Domänen transferieren Malonsäurederivate auf das ACP des PKS- oder FAS-Moduls.

Die KS-Domäne entspricht in ihrer Funktion der C-Domäne in den NRPS und katalysiert die C-C Verknüpfung (siehe Abb. 2.21). Die KS-Domäne enthält einen Cysteinrest im aktiven Zentrum (Dreier and Khosla, 2000; Huang *et al.*, 1998; Moche *et al.*, 2001).

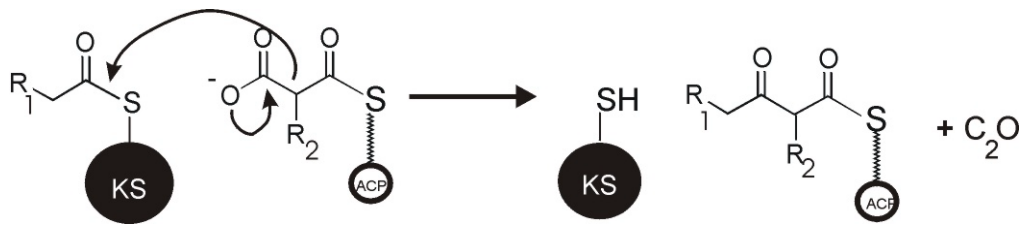


Abb. 2.21: Die Reaktion der Ketosynthase-(KS)-Domäne. KS-Domänen katalysiert die C-C Verknüpfung zwischen dem Acyl-Thioester und dem Malonsäurederivat auf ACP unter Dekarboxylierung.

Durch eine Decarboxylierung des ACP gebundenen Malonsäurederivates entsteht ein Nukleophil, das in der Lage ist, die Carboxygruppe des an der KS-Domäne gebundenen Intermediats anzugreifen und diese dadurch als β -Keto-Karbonsäure auf das ACP zu übertragen (Abb. 2.21) (Huang *et al.*, 1998). Durch optionale Domänen wie der Ketoreduktase-(KR)-Domäne, der Dehydratase-(DH)-Domäne und der Enoylreduktase-(ER)-Domäne können über Zwischenstufen aliphatische Karbonsäuren gebildet werden. Die Reihenfolge der Domänen entspricht der eingebauten Bausteine im Produkt, d. h. die PKS gehorchen wie die NRPS der Kolinearitätsregel (Du *et al.*, 2001).

Die FAS sind ähnlich wie PKS organisiert mit dem Unterschied, dass die FAS nicht modular aufgebaut sind und dass die Fettsäuren durch repetitive Verwendung der entsprechenden Enzyme synthetisiert werden (Schweizer, 1996). Wohl aber ist die Synthesemaschinerie der FAS und der PKS in der Abfolge und Art der Synthese sehr ähnlich.

2.6.2. Die quartärstrukturen von FAS, PKS und NRPS

Bis jetzt existiert noch keine 3D-Struktur einer NRPS, FAS oder PKS, ebenso wenig von einem Modul (Sieber *et al.*, 2002). Eine strukturelle Aufklärung der quartären Struktur dieser Multienzymkomplexe war deshalb bisher nicht möglich. Deshalb ist man auf die chemischen und biochemischen Methoden zur Charakterisierung der Quartärstruktur dieser Multienzymkomplexe angewiesen beschränkt. Die entsprechenden Daten sind in den folgenden Kapiteln kurz zusammengefasst.

2.6.2.1. Fettsäuresynthasen (FAS)

Die FAS der Eukaryoten sind im Gegensatz zu denen der Prokaryoten als Multienzymkomplexe aufgebaut (Cronan *et al.*, 1969; Lust *et al.*, 1968), z. B. sind in *S. cerevisiae* die gesamten Enzyme für die Fettsäure-Biosynthese auf zwei Synthasen verteilt (Schweizer *et al.*, 1984; Stoops and SJ., 1980). Die früheren Studien mit Gelfiltration und

SDS-Gelelektrophorese (Stoops and SJ., 1980; Stoops and SJ., 1982) und neueren Untersuchungen mittels Mutationsanalyse und Cross-Linking-Reaktionen mit 1,3-Dibromopropanon weisen alle auf eine dimere Struktur von FAS Proteinen auf (Fichtlscherer *et al.*, 2000; Witkowski *et al.*, 1998). Dabei wurde das Modell der Kopf-zu-Schwanz Orientierung postuliert (siehe Abb. 2.22) (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

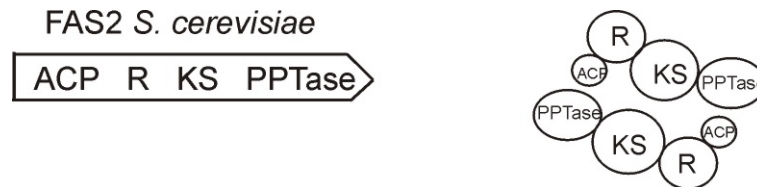


Abb. 2.22: Postulierte Quartärstruktur von FAS2 aus *S. cerevisiae*. Die FAS2 beinhaltet eine ACP, Reduktase, KS- und eine PPTase-Domäne. Mithilfe der Mutationsanalyse wurde eine Kopf-zu-Schwanz Orientierung postuliert (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

2.6.2.2. Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketidsynthasen sind ebenfalls modular organisierte Multienzymkomplexe wie FAS und NRPS (Cane and Walsh, 1999; Cane *et al.*, 1998). PKS nutzen, trotz der großen Bandbreite von Produkten, nur die Bausteine Acetat- und Propionat, sowie deren Derivate für ihre Biosynthese. Wie bei den NRPS lassen sich die Module in einzelne Domänen unterteilen (siehe 2.6.1) (Du *et al.*, 2001; Mootz *et al.*, 2002b). Die Untersuchungen mit Hilfe von Ultrazentrifugation, Gel-Filtration und Cross-Linking weisen alle, wie bei den FAS, darauf hin, dass auch die PKS Dimere bilden (Gokhale *et al.*, 1998; Staunton *et al.*, 1996). Anhand von Mutationen, proteolytischem Verdau und Cross-Linking wurde ein Modell mit einer dimeren, doppelt helikalen Struktur für die PKS-Proteine wie der 6-Deoxerythronolid B Synthase (DEBS) vorgeschlagen (Chuck *et al.*, 1997; Staunton, 1998). Es wird angenommen, dass sich die Enzymstränge zuerst in Domänen falten und dann unter Bildung einer Helix nebeneinander Kopf-zu-Kopf anordnen (siehe Abb. 2.24) (Heathcote *et al.*, 2001). KS-, ACP- und AT-Domäne bilden den Kern des dimeren Multienzymkomplexes und erlauben den für die Kondensation wichtigen Kontakt von KS und ACP des gleichen Moduls auf unterschiedlichen Strängen. Dabei sind die optionalen Domänen außerhalb des Kernbereiches lokalisiert (Heathcote *et al.*, 2001; Staunton, 1998) (siehe Abb. 2.23).

Die kürzlich gelöste Kristallstruktur der Te-Domäne von DEBS6 bekräftigt die Vermutung des dimeren Charakters von PKS und das Kopf-zu-Kopf Modell (Tsai *et al.*, 2001). Die Te-Domäne von DEBS6, die als Dimer kristallisiert wurde, ist über Leucinreiche Helices mittels hydrophober Wechselwirkung miteinander verbunden (Tsai *et al.*, 2001).



Abb. 2.23: Postulierte Quartärstruktur von PKS (DEBS3). Die DEBS3 beinhaltet eine KS, AT, KR, ACP, KS, AT, KR, ACP und eine Te-Domäne. Mithilfe von Mutationsanalyse, Cross-Linking und der Kristallstruktur der Te-Domäne wurde eine Kopf-zu-Kopf Orientierung postuliert (Heathcote *et al.*, 2001).

2.6.2.3. Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)

Verglichen mit den Fettsäuresynthetasen und den Polyketidsynthetasen ist über die quartäre Organisation von NRPS bisher wenig bekannt. Die früheren Untersuchungen zur Enterobactin-Synthetase (Gehring *et al.*, 1998a) und die 500 kDa große δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin-Synthetase mittels Gelchromatographie (Schwecke *et al.*, 1992) zeigten, dass nicht eindeutig ist, ob die NRPS als Monomer oder als Dimer vorliegen. Die aktuellen Untersuchungen von Sieber und Mitarbeitern mit Hilfe von Ultrazentrifugation, Gel-Filtration und Cross-Linking, Mutationsanalyse und Massebestimmungen mit Maldi-TOF zeigen jedoch nun deutlicher, dass die NRPS Synthetasen wie GrsA oder ProCAT (TycB1) als Monomer vorliegen (siehe Abb. 2.4) (Sieber *et al.*, 2002). Diese Daten werden anhand von verschiedenen bekannten Strukturen wie die von A-, PCP-, C- und Te-Domäne bestätigt, da diese Domänen bis jetzt alle nur als Monomere kristallisiert wurden (Bruner *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 1997; Keating *et al.*, 2002; May *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2000).

Die Frage, ob NRPS-PKS Hybridenzyme, die ebenfalls in der Natur vorkommen, als Monomer oder Dimer organisiert sind, wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie und Gelfiltration untersucht. Die Masse des HMWP1 (das einen PKS-Anteil enthält) zeigt, dass sowohl das Monomer als auch die dimerisierte Form vorkommt. Bisher gibt es jedoch dazu keine genaue Modellvorstellung (Sieber *et al.*, 2002).

2.7. Aufgabenstellung

Ziel dieser Dissertation war es die mit nichtribosomalen Peptidsynthetasen assoziierten 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen zu charakterisieren.

In dieser Arbeit sollte der restliche Teil der Struktur für den Komplex von Sfp mit CoA in Kooperation mit Dr. Klaus Reuter interpretiert werden und anhand von Mutationen auf die vermutliche Funktion der wichtigsten Reste in der CoA-Bindungstasche geschlossen werden. Zusätzlich sollten Information über die PCP-Erkennungstasche und den Reaktionsmechanismus

der 4'-Phosphopantetheinylierungs-Reaktion (Priming-Assay) durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten mit Sfp Mutationanalysen durchgeführt werden.

Schließlich sollten Untersuchungen zu den Spezifitäten von PPTasen durchgeführt werden.

Zu diesem Zwecke sollten Mutationen in PCP eingeführt werden, um die Erkennung durch verschiedene PPTasen *in vivo* und *in vitro* zu testen.

Zum anderen sollte die 3D-Struktur von NRPS -Domänen anhand von Röntgen- und NMR-Strukturanalysen geklärt werden. Hierbei sollten an folgende Domänen kristallisation Experimente bzw. NMR-Messungen unterzogen werden:

TE II (TEII) aus der Surfactin-Synthetase, E-Domäne (TycA), PCP-E Bidomäne (TycA) und E-Domäne (TycB3) aus der Tyrocidin-Synthetase.

3. Material

3.1. Enzyme, Chemikalien, und Kits

Tabelle 3.3: Liste der benutzten Enzyme, Chemikalien und Kits: Nicht aufgeführte Chemikalien stammen von Merck (Darmstadt) und besaßen p.a. Qualität.

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Applied Biosystems(Weiterstadt)	ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V 2.0
Amersham/Buchler (Braunschweig)	λ -DNA, Restriktionsendonucleasen, DNA-Modifizierende Enzyme, Ampicillin, IPTG, Kanamycin, Hefeextrakt, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1
Biomol (Ilvesheim)	DTT und DTE
Biotrend (Köln)	[^{14}C]-D-Phenylalanin
Boehringer Mannheim (Mannheim)	Expand Long Range PCR Kit
Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover (Massachusetts,USA)	^{15}N –Ammoniumchlorid
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt
DuPont/NEN (Bad Homburg)	^{32}P -Pyrophosphat (16 Ci/mmol)
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektrotransformations-Küvetten
Fluka (Neu Ulm)	SDS, TEMED
Genomed (Bad Oenhausen)	Jetsorb-DNA-Extraktionskit
Gibco BRL (Eggenstein)	10 kDa Proteinmolmarker
Hartmann-Analytik (Braunschweig)	[^3H]-CoA (40 Ci/mmol, 0,95 mCi/mL), [^{14}C]- und [^3H]-markierte Aminosäuren
IBA (Göttingen)	Strep-Tactin Sepharose Column
Macherey & Nagel (Düren)	Nucleospin Extraction Kit for Nucleic acids
Merck (Darmstadt)	HPTLC-Fertigplatten CHIR (chiral, 10x10 cm) und Silica gel 60 DC-Alufolien (20x20 cm), versch. Feinchemikalien, Vivaspin-Konzentratoren
Millipore (Molsheim)	Sterilfilter (Porengröße 45 nm) Nitrocellulose Filter Blatt (Porengröße 0,025 μm)
MWG Biotech (Ebersberg)	Synthetische Oligonucleotide
New England Biolabs (Schwalbach)	Vent-Polymerase, Restriktionsendonucleasen

Oxoid (Wesel)	Agar Nr.1, Trypton
Qiagen (Hilden)	tip20- und tip100-Anionenaustauschersäulen, QIAquick-spin PCR Purification Kit, NI-NAT- Agarose, QIAexpress Vektor Kit ATG
Roth (Karlsruhe)	EtBr, X-Pho, NBT, β -Mercaptoethanol, Acrylamid- Lsg. für SDS-PAGE, Rotiszint Eco Plus
Schleicher & Schüll (Dassel)	Sterilfilter (Porengröße 0,45 μ m), Glasfaservorfilter GF 92, Mischestermembranfilter M25 (Porengröße 0,2 μ m)
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylencyanol, Triton X-100, Tween-20, Visking-Dialyseschläuche
Sigma (Deisenhofen)	EDTA, Desoxynucleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
Stratagene (Heidelberg)	QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit, <i>Pfu</i> turbo polymerase
United States Biochemicals (Bad Homburg)	Restriktionsendonucleasen (<i>Ava</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, <i>Nco</i> I), RNase, Lysozym, Ampicilin, IPTG, Kanamycin, IPTG, l-DNA, Hefeextrakt, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1

3.2. Geräte

Tabelle 3.2 Geräte, Hersteller und Typenbezeichnung: Bei nichtaufgeführten Geräten handelt es sich stets um Standardmodelle üblicher Laborgerätehersteller.

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
DNA-Sequenzier	Perkin-Elmer/ABI, ABI Prism 310 Genetic Analyser
Elektroporations-Pulser	Bio-Rad Gene Pulser und Pulse-Controller
FPLC-System	<i>Amersham-Pharmacia</i> Äkta-Prime und Äkta-Purifier Hi Load™ 16/60 Superdex Prep grade Hi Load™ 26/10 Phenyl-Sepharose High Performance Hi Load™ 26/10 Q-Sepharose High Performance
French Press	Sim Aninco; French-Presssure Cell-Version 5.1 20k Rapid-fill cell (40 mL)
Heizschüttler	<i>Eppendorf</i>
HPLC-MS-System	<i>Agilent/Hewlett Packard</i> Series 1100 MSD HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation Software
HPLC-Trennsäulen“	<i>Macherey & Nagel</i> „Nucleosil C18 3/120 3-250 Säule
Ionenaustauscher für Wasser	Seral Seralpur Pro90CN
Lesegerät für Mikrotiterplatten	Dynatech MR 7000
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000
Radioaktivitätsscanner	<i>Raytest</i> RITA
Speed-Vac	Savant Speed Vac Concentrator Uniequip Univapo 150 H
Szintillationszähler	Packard 1900CA Tri-CARB Liquid Szintillation Analyzer
Thermo-Cycler	<i>Perkin Elmer</i> Thermal Cycler 480 <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR System 9600
Zentrifugen	Heraeus Biofuge pico, Minifuge RF und Megafuge, Sorvall RC26 plus und RC5B und Ultra Zentrifuge <i>Beckman</i> L5
MALDI-TOF	Voyager-DE™RP Biospektrometry™ Workstation Per Septive Biosystem

3.3. Mikroorganismen

3.3.1. Escherichia coli XL1-Blue

XL1-Blue wurde routinemäßig zur Klonierung und Sequenzierung eingesetzt. Der Genotyp ist hier kurz beschrieben (Bullock *et al.*, 1987): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, F'(proAB, *lacI*^q, *lacZDM15*, Tn10(tet^r))] (Bullock *et al.*, 1987).

3.3.2. Escherichia coli BL21 (λDE3):

BL21(λDE3) zeigt eine hohe Expression von Plasmid-DNA, dies steht unter einem IPTG-induzierbaren Promotor der T7-RNA-Polymerase, deren Gen nach dem *lacUV5*- und *LacZ*-Promotor auf dem Prophagen im Chromosom des Stammes insertiert ist. Das *lacUV5* erlaubt die Induktion in glucosehaltigem Medium. Weitere Besonderheiten sind sowohl eine hohe Zelldichte im Vergleich zu *E. coli* K., als auch das Fehlen der Proteasen Lon (Protease) und OmpT (Protease der Außenmembran), die in *E. coli* K zum cytosolischen Abbau rekombinanter Proteine bzw. zu einer Proteolyse während der Aufreinigung führen können. Der Genotyp ist hier kurz beschrieben (Studier and Moffatt, 1986): *F*⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r_B*⁻ *m_B*⁻), *gal* λ, (DE3) (Grodberg and Dunn, 1988; Studier and Moffatt, 1986).

3.3.3. Escherichia coli M15

Dieser Stamm ist einer der für das Expressionssystem „QIAexpress“ (Qiagen) empfohlenen Expressionsstämme. Dieser Stamm erhält das Plasmid pREP4. Sein Genotyp sieht wie folgt aus: *nal*^s, *str*^s, *rif*^s, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, *F*⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺ (Zamenhof and Villarejo, 1972).

3.3.4. Escherichia coli SG13009

Dieser Stamm wird ebenfalls für das Expressionssystem „QIAexpress“ (Qiagen) (Qiagen, 1997) empfohlen und wurde alternativ zu *E. coli* M15 verwendet. Dieser Stamm erhält das Plasmid pREP4. (Gottesman *et al.*, 1981). Sein Genotyp sieht wie folgt aus: *nal*^s, *str*^s, *rif*^s, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, *F*⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺.

3.3.5. *Bacillus brevis* ATCC 8185

Bacillus brevis ATCC 8185 ist der Wildtyp-Stamm und Produziert Tyrocidin und Gramicidin A.

3.4. Medien und Lösungen

Zur Anzucht der *E. coli* XL1-Blue, M15, SG13009 und BL21(DE3) Stämme diente das LB-Medium, welches zur besseren Löslichkeit der Proteine bei der Expression 10 mM MgCl_2 (Stachelhaus *et al.*, 1996) enthielt:

LB-Medium:	16	g/L	Bactotrypton
	10	g/L	Hefeextrakt
	5	g/L	NaCl

Zur Vorbeugung von Phageninfektionen wurde nach dem Autoklavieren der LB-Medium Natriumcitrat (Endkonzentration 20 mM) zugegeben.

Gegebenenfalls wurde *E. coli* M15 oder SG13009 auf M9-Medium angezogen. Zur Anfertigung des Mediums wurden Lösung I und II getrennt autoklaviert, im Verhältnis 89:10:1 (H_2O : Lsg. I : Lsg. II) gemischt und mit 1 mL sterilfiltriertem 1 M Thiaminiumchlorid und d-Biotin versetzt.

M9-Medium:

Lösung I (pH 7,4)	60	g/L	Na_2HPO_4
	30	g/L	KH_2PO_4
	5	g/L	NaCl
	10	g/L	NH_4Cl
Lösung II	2,2	g/L	CaCl_2
	24,6	g/L	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	200	g/L	Glukose

(als Flüssigmedium für die Überexpression ^{15}N -und ^{15}N , ^{13}C -markierter Proteine) eingesetzt wurde.

Zur Herstellung fester Nährmedien wurde 1.2% (w/v) Agar Nr.1 mit flüssigem Medium versetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medien vor dem Gebrauch 20 min bei 121°C (Glukose-haltige Lösungen bei 110°C) und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z.B. Antibiotika wurden den Medien als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50°C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

100	$\mu\text{g/mL}$	Ampicilin
25	$\mu\text{g/mL}$	Kanamycin

10	µg/mL	Tetracyclin
4	µg/mL	X-Gal
50	µg/mL	IPTG

3.5. Vektoren:

3.5.1. pQE60 und pQE70

Die pQE60 und pQE70-Vektoren gehören zur Familie der pDS-Plasmide und basieren auf dem Plasmid pDS56/RBSII (Stüber *et al.*, 1990). Die beiden pQE-Vektoren sind C-terminale Histidinkodon (His₆-tag) und werden zur Expression des DNA-Fragment verwendet (Qiagen, 1997). Das Plasmid enthält das β -Lactamasegen *bla*, welches eine Resistenz gegen Ampicillin (amp¹⁰⁰) verleiht. Der Replikationsursprung (ColE1) wurde aus pBR322 entnommen. Des weiteren sind folgende Komponenten im Vektor beinhaltet:

- T5-Operator eines *E. coli*-Phagens
- synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII
- optimierte Promotor/Operator-Region
- zwei *lac*-Operatorsequenzen zur Expressionskontrolle
- MCS mit Erkennungssequenzen bei:
 - pQE60: *Nco*I (beinhaltet das ATG-Startkodon), *Bam*HI, *Bgl*II
 - pQE70: *Sph*I (beinhaltet das ATG-Startkodon), *Bam*HI, *Bgl*II
- Stopcodons 0, -1, -2
- zwei Transkriptionsterminatoren t₀ des λ -Phagen (Schwartz, 1985)

pQE-60 und pQE70 Vektor (jeweils 3431 bp) diene zur Expression aller verwendeten Peptidsynthetasemodule und ihrer Fragmente. Da die Expression der gewünschten Gene mit Hilfe der *lac*-Operatoren reprimierbar ist, wurde diese stets in Gegenwart des Plasmides pREP4 durchgeführt, welches den *lac*-Repressor kodiert. Die Expression wurde dann mit IPTG induziert, welches eine Konformationsänderung des *lac*-Repressors bewirkt, was zu einer Dissoziation des *lac*-Repressors vom *lac*-Operator führt.

Die exprimierten Gene werden durch QIAexpressionist System mittels IMAC (engl. *Immobilized-metal affinity chromatography*) gereinigt.

3.5.2. pREP4

Die Genexpression im Plasmid pQE60 und pQE70 steht unter der Kontrolle des T5-Promotors und ist aufgrund der optimierten Promotor/Operator-Region sehr effizient (Qiagen,

1997). Der T5-Promotor kann in Gegenwart extrem hoher lac-Repressor Konzentration in der Zelle vollständig unterdrückt werden, da die von *E.coli* BL21 als Wirtstamm produzierte Menge nicht ausreicht. Das *low-copy* Helfer Plasmid pREP4 ist 3740 bp und trägt das lac-Repressor kodierende *lacI* Gen. Das *neo*-Gen vermittelt die Kanamycin-Resistenz (kan²⁵). Das pREP4 ist aufgrund seines Replikationsursprungs kompatibel zu allen Plasmiden mit ColE1-Ursprung wie pQE60 (Farabaugh, 1978).

3.5.3. pTZ18

Das 2,87 kb große Plasmid pTZ18 (Gilbert, 1991) besitzt den *ori* pMB1, der für eine Kopienzahl von 500-700 Plasmiden pro *E. coli* Zelle verantwortlich ist. Für die Selektion dient das *bla*-Gen, dessen Genprodukt β -Lactamase die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. Durch Insertion in den Polylinker (MSC, multiple cloning site) wird eine blau / weiße Selektion auf X-Gal Agarplatten ermöglicht. Auf der einen Seite der MCS befindet sich ein T7 Promotor, der eine gesteuerte Expression erlaubt.

3.5.4. pASK-IBA 3

Der Vektor diente zur Expression der NRPS-Gene GrsA und ProCAT mit C-terminalen Strep-tag II (Schmidt *et al.*, 1996; Voss and A., 1997). Der Vektor gestattet die Aufreinigung der überproduzierten Proteine mittels Strep-Tactin-Säulen, da am Ende der MCS eine Kodonsequenz eingefügt ist, die nach Fusion des Vektors mit dem zu exprimierenden Gen einen C-terminalen Strep-tag an das überproduzierte Protein anfügt (IBA, 2002). Der Strep-tag besteht aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK).

pASK-IBA3 Vektoren arbeiten mit dem stringent regulierten *tet*-Promotor. Der *tet*-Promotor wird durch die Zugabe sehr geringer, nicht antibiotisch wirksamer Konzentrationen an Anhydrotetracyclin induziert. Der *tet*-Promotor unterliegt keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen, wie der lac-Promotor.

Das Plasmid enthält außerdem folgende Komponenten: Replikationsursprung aus pUC Plasmiden und Ampicillin-Resistenz.

4. Methoden

In dem Methodenteil sind nur die Techniken beschrieben, die sich grundlegend von den in Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) beschriebenen Methoden der molekularen Genetik und Biochemie unterscheiden. Bei der Verwendung von Kits wurden, sofern nicht gesondert angegeben, die Protokolle des Herstellers oder zuvor beschriebenen Standard-Techniken befolgt. Die Reinigung von DNA und die Präparation chromosomaler DNA aus *B. brevis* und *B. subtilis* erfolgte mittels Qiagen-Kits, denen das von Vogelstein *et al.* entwickelte Prinzip der Anionenaustauscher Chromatographie zugrunde liegt (Vogelstein and Gillespie, 1979).

4.1. Molekularbiologische Methoden – DNA Techniken

4.1.1. PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation aller benötigten DNA-Fragmente benutzt. Dazu wurden, je nach Bedarf, die folgenden Polymerasen verwendet:

ExpandTM Long Template PCR Kit (*Böhringer Mannheim*, Mannheim)

Vent_R-DNA-Polymerase (*New England Biolabs*, Schwalbach)

Pfu TurboTM DNA-Polymerase (*Stratagene*, Heidelberg)

HerculaseTM Hotstart DNA-Polymerase (*Stratagene*, Heidelberg)

Die Eigenschaft dieser Polymerasen sind im Folgenden dargestellt:

ExpandTM Long Template PCR Kit (*Böhringer Mannheim*, Mannheim): enthält die beiden DNA-Polymerasen *Taq* (*Termus aquqticus*) und *Pwo* (*Pyrococcus woesei*). Der Mix ist für Amplifikationen bis zu 30 kb geeignet. Die Fehlerrate beträgt dabei $1:2,82 \times 10^5$, die Polymerisationstemperatur 68 °C. Die Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt ungefähr 40 s für 1 kb. Die PCR-Fragmente können ein 3'-Überhängendes Adenin enthalten, so dass für *blunt-end* Ligationen die Enden abgeglichen werden müssen.

Vent_R-DNA-Polymerase (*New England Biolabs*, Schwalbach):

Vent-DNA-Polymerase stammt aus *Thermococcus litoralis* und ist für Amplifikationen bis zu 5 kb geeignet, die Fehlerrate beträgt dabei $1:3,62 \times 10^5$, Polymerisationstemperatur 72 °C, bei einer Amplifikationsgeschwindigkeit von 1 kb/min. Die PCR-Fragmente enthalten bis zu 95% glatte Enden.

Pfu TurboTM DNA-Polymerase (*Stratagene*, Heidelberg):

Pfu-Turbo-DNA-Polymerase stammt aus *Pyrococcus furiosus* und enthält zusätzlich den Pfu-Turbo-PCR Stabilisierungsfaktor. Die Polymerase ist für Amplifikationen bis zu 10 kb geeignet und die Fehlerrate beträgt $1:7,62 \times 10^5$. Die optimale Polymerisationstemperatur beträgt 72 °C, die Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt dabei 1 kb/min. Alle PCR-Fragmente haben glatte Enden.

HerculaseTM Hotstart DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

Enthält die Pfu-DNA-Polymerase kombiniert mit dem Pfu-Turbo-PCR Stabilisierungsfaktor und kleinen Mengen *Taq* 2000TM DNA-Polymerase. Das Gemisch ist für Amplifikationen von 0,1 bis 48 kb geeignet, die Fehlerrate beträgt $1:4,2 \times 10^5$, die Polymerisationstemperatur 68 °C und die Amplifikationsgeschwindigkeit ist 1 kb/min. Die PCR-Fragmente enthalten teilweise überstehende Enden.

Bei der PCR wurde die Länge der Zyklen an die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente angepasst, die Hybridisierungstemperaturen (*Annealing*) nach Art der verwendeten Primer variiert. In der Regel wurden die Primer so ausgewählt, dass die *Annealing*-Temperaturen im Bereich von 50-65 °C lagen. An den Enden wurden zur späteren Klonierung nach Bedarf Erkennungsschnittsequenzen der gewünschten Restriktionsendonukleasen durch die Wahl geeigneter Oligonukleotidsequenzen für die PCR eingeführt. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

PCR-Ansatz DNA-Templat	0,05-0,5 ng
Oligonukleotide jeweils	25 pmol
dNTP's (Stammlösung je 2mM)	2,5 µL
10x PCR-Puffer III	
(Expand TM Long Template)	2,5 µL
Polymerase-Mix (1 U/µL)	0,25 µL
ddH ₂ O	add 25 µL

10x PCR-Puffer III	20 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	100 mM KCl
	1 mM DTT
	0,1 mM EDTA
	0,5% (v/v) Tween 20
	0,5% (v/v) Nonidet P40
	22,5 mM MgCl ₂ und detergentien
	50% Glycerol

Bei GC-reichen DNA-Templaten wurden 3% DMSO zugegeben. Dies führt zu einem Verbesserten aufschmelzen der DNA-Template.

Anschließend wurde der Ansatz in einer PCR-Maschine nach folgendem allgemeinen Programm inkubiert [(a1) = Annealing Temp. - 3°C; (a2) = (a1) + 5°C (max 65°C); (ez) = Elongationszeit, für Taq/Pwo beträgt sie 40 s pro 1 kb Amplifikat]:

Taq/Pwo-Polymerase:

94°C	2 min		
5 Zyklen		25 Zyklen	
94°C	15 s	94°C	15 s
(a1)°C	30 s	(a2)°C	30 s
68°C	(ez) s	68°C	(ez) s + 5 s pro Zyklus

4.1.2. Gezielte Punktmutagenese

Die in dieser Arbeit hergestellten Mutationen wurden durch zwei Methoden eingeführt. Bei der ersten Methode wurden die Mutationen mit dem QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*) eingeführt. Hierbei wurde die zum Kit gehörende Pfu-TurboTM-DNA-Polymerase (*Stratagene*) benutzt. Bei der zweiten Methode handelt sich um eine inverse PCR. Dazu wurden Primer verwendet, die die gewünschte Mutation und eine zusätzliche Schnittstelle zur späteren Ligation an den Enden enthielten. Bei der inversen PCR-Methode wurde für DNA-Fragmente bis zu 5 kb Vent- und bei größeren Fragmenten Herculase-Hotstart-DNA-Polymerase benutzt. Nach erfolgreicher Amplifikation der DNA-Fragmente wurde der PCR-Ansatz gereinigt und mit der jeweiligen DNA-Restriktionsendonuklease und *DpnI* verdaut. Dadurch kann man gezielt die Template DNA entfernen (*DpnI* erkennt methylierte dann und schneidet diese, während die amplifizierte DNA keine Methylierung aufweist). Anschließend wurden die DNA-Fragmente ligiert und *E. coli* XL1Blue mit ihnen transformiert.

4.1.3. DNA-Sequenzierung

Für die Überprüfung der DNA Abfolge, wurden die jeweiligen Plasmide sequenziert. Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger verfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die ddNTPs enthielten für jede der vier Basen einen chemisch an das Molekül gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer energetischen Anregung durch einen Laser, Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Ein solcher

Ansatz wurde einer elektrophoretischen Trennung unterworfen, so dass sich direkt die Sequenz der DNA-Matritze ermitteln ließ.

Ein Reaktionsansatz enthielt 100 ng DNA pro kbp Template DNA, 5 pmol Primer und 3 µL „Terminations Mix“ (enthält dNTPs, markierte ddNTPs, Puffer und AmpliTaq DNA Polymerase FS). Die Reaktion wurde in einem 200 µL PCR-Reaktionsgefäß nach dem Auffüllen mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µL durchgeführt. Anschließend wurde dieser Ansatz unter den folgenden Bedingungen in einem PCR-Gerät inkubiert.

DNA-Sequenzierungsprogramm:

1 Zyklus	96°C	30 s
25 Zyklen	96°C	10 s
	50°C	15 s
	60°C	4 min

Der Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µL 3 M NaOAc (pH 4,6), 80 µL ddH₂O und 250 µL 100 %igem EtOH gemischt und 20 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 250 µL 70 %igem EtOH gewaschen und 10 min bei RT zentrifugiert. EtOH wurde vorsichtig entfernt, der Reaktionsansatz 30 min bei 50 °C getrocknet und in 40 µL HPLC-Wasser resuspendiert (10 min bei 50 °C im Heizschüttler). Die Probe wurde nach 2 minütiger Denaturierung bei 95 °C in ein entsprechendes Probengefäß pipettiert, welches zum Schutz vor Verdunstung mit einem Septum verschlossen wurde. Diese Proben wurden nun mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer gemäß den Herstellerangaben sequenziert. Hierbei konnten bis zu 600 bp gelesen werden.

4.2. Protein-Techniken

4.2.1. Genexpression

Für die heterologe Expression von Peptidsynthetasegenen in *E. coli* wurden die beiden Expressionssysteme „QIAexpressionist“ (Qiagen, Hilden) oder pASK-IBA (IBA, Göttingen) verwendet (IBA, 2002; Qiagen, 1997) und zum Schluss wurde eine Gelfiltration durchgeführt.

4.2.1.1. Expression mit dem pQE-Vektorsystem:

Für die Expression mit dem pQE-Vektor-System in die *E. coli*-Stämme BL21, M15 oder SG13009 wurden die pQE-Vektoren mit dem NRPS-Gen in den *E. coli* Stamm transformiert.

E. coli M15 und SG13009 Stämme enthalten bereits das Plasmid pREP4 (siehe 3.5.2). Zur Genexpression wurde vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen mit einer Übernachtskultur der gewünschten Produzentenstämmen 1:100 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 250 rpm im Luftschüttler angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,2 wurde die Temperatur auf 28°C eingestellt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG-Lösung induziert (Endkonzentration 0,1 mM). Nach der Induktion wurde für weitere zwei Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Zellen werden bei 17000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert in HEPES-Puffer A (siehe 4.2.3) resuspendiert und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Kontrolle der Expression erfolgte durch SDS-PAGE des Gesamtzellextraktes und anschließender Färbung mit Coomassie Blue oder immunologischer Detektion durch das Western-Blott-Verfahren. Die Aufreinigung der terminalen His₆-tag-Fusionsproteine erfolgte zuerst mittels der Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und anschließend über Gelfiltration. Als Matrix wurde Nitrilotriacetat verwendet („Nickel-NTA-Superflow“ Firma Qiagen). Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) kontrolliert und die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Bradford-Tests in einem Spektrometer der Firma Dynatech bestimmt. Gegebenfalls wurden die Konzentrationen photometrisch bei der Wellenlänge 280 nm (A₂₈₀ nm) bestimmt (Gill and vonHippel, 1989) oder nach Bradford (Bradford, 1976).

4.2.1.2. Expression mit dem pASK IBA3-Vektor-System

Für die Expression mit dem pASK IBA3-Vektor-System in M15-Zellen wurde vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen mit einer Übernachtskultur der gewünschten Produzentenstämmen 1:100 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 250 rpm im Luftschüttler angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,2 wurde die Temperatur auf 28°C eingestellt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression durch Zugabe von einer Anhydrotetracyclin-Lösung (Endkonzentration 40 nM) induziert. Nach der Induktion wurde für weitere zwei bis drei Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Zellen werden bei 17000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und in Puffer W resuspendiert und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.2.1.3. Expression und Reinigung von Proteinen ohne Affinitätschromatographie:

Die Expression von Proteinen erfolgt wie bei beschriebene Verfahren mit dem pQE-Vektor-System in die *E. coli*-Stämme B121, SG13009 oder M15. Die Reinigung von Proteinen ohne

His₆-Tag oder Strep-Tag erfolgte durch Ammonium Sulfat-Fraktionierung (30, 60 und 90%), Q-Sepharose (Anionenaustauscher)-Chromatographie und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie mittels Phenyl-Sepharose. Zum Schluss wurde eine Gelfiltration durchgeführt.

4.2.2. Präparation von Rohzelleextrakten

Das bei der Expression erhaltene Zellpellet wurde bei 4 °C mit Hilfe einer *French-press*® der Firma *Sim Aminco* aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde insgesamt dreimal durch eine *French-press*® gegeben. Bei dieser Behandlung werden die Zellwände durch Scherkräfte, die durch die plötzliche Entspannung nach sehr hohem Druck (1000 psi) resultieren, zerrissen, wobei der Rohzelleextrakt freigesetzt wird. Das Gemisch aus Zelltrümmern, unlöslichen und löslichen Proteinen wird für 30 min bei 35000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf Eis aufbewahrt und anschließend auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen. Von dem Überstand und dem Pellet wurde eine Probe genommen und mittels einer SDS-PAGE analysiert. Zum Schluss wurde eine Gelfiltration (Als Puffer wurde Dialyse-Puffer verwendet siehe 4.2.4) durchgeführt.

Der denaturierende Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine zweistündige Inkubation bei RT in Harnstoff-Bindpuffer (Harnstoff-Puffer B, siehe 4.2.5). Nach dem denaturierenden Aufschluss wurden die löslichen Proteine durch eine 45-minütige Zentrifugation bei 35000 g und 25°C von den Zelltrümmern getrennt.

4.2.3. Native Aufreinigung der His₆-Tag Fusionsproteine

Die Immobilisierte Metallionen- Affinitätschromatographie (IMAC) wurde von Porath und Mitarbeitern (Porath *et al.*, 1975) eingeführt und erlaubt eine schnelle Reinigung der mit einem His₆-Tag versehenen rekombinanten Proteine (Hochuli, 1989). Eine Chelatisierung der an der Säulenmatrix immobilisierten Ni²⁺-Ionen durch die Histidinreste des His₆-Tag führt zu einer sehr starken Bindung des Proteins an die Säule und bewirkt so die Trennung von den übrigen Proteinen im Rohzelleextrakt (sofern diese keine größere Anzahl an Histidinresten tragen). Zur Reinigung von etwa 5-10 mg Protein aus 400 mL Zellkultur wurden 1,5-2 mL Säulenvolumen der Matrix für die FPLC-Säule verwendet. Dabei wurde die Säule bei einer konstanten Flussrate von 0,75 mL/min mit 10 Säulenvolumina 100% HEPES-Puffer A equilibriert und mit dem Rohzelleextrakt aus dem Zellaufschluss beladen (bei 4 °C). In einem linearen Gradienten wurde der Anteil an HEPES-Puffer B in der mobilen Phase in 60 min von

0% auf 50% und anschließend in 5 min von 50% auf 100% erhöht. Der Puffer enthält 250 mM Imidazol, welches eine höhere Affinität zu den Nickel-Ionen aufweist und somit in der Lage ist das gebundene Protein von den Nickel-Ionen abzulösen. Das Eluat konnte dann in einem Fraktionssammler (Fraktionsgröße 1,5 mL) fraktioniert gesammelt werden. Nach der Kontrolle der Fraktionen auf einem SDS-Gel wurden Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereinigt und in einem Dialyseschritt auf definierte Pufferbedingungen eingestellt (siehe 4.2.4). Zum Schluss wurde eine Gelfiltration (als Puffer wurde Dialyse Puffer verwendet) durchgeführt.

HEPES-PufferA	50 mM HEPES (pH 7,8) 300 mM NaCl
HEPES-PufferB	50 mM HEPES (pH 7,8) 300 mM NaCl 250 mM Imidazol

Bei instabilen Proben (z.B. bei der Sfp-Mutante T44S) wurde den HEPES-Puffern A und B jeweils 30% Glycerol zugegeben.

4.2.4. Dialyse von Proteinlösungen

Es wurde dreimal gegen das 100-fache Volumen eines frisch hergestellten Dialyse-Puffers bei 4°C für 4-5 h dialysiert. Die verwendeten Dialyseschläuche wurden vorher zur Entfernung von Proteasen und Schwermetallionen, in einer 10 mM EDTA-Lösung für 10 min unter leichtem Rühren gekocht und gründlich mit ddH₂O gespült.

Dialyse-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,8) 2 mM DTT 100 mM NaCl
----------------	--

4.2.5. Denaturierende Aufreinigung der His₆-Tag Fusionsproteine mittels IMAC

Das Ni-NTA Superflow Säulenmaterial ist auch für die denaturierende Aufreinigung von His₆-Tag Proteinen geeignet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Harnstoff-Puffer B wurde der Rohextrakt aufgetragen. Zum Waschen der Säule wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Harnstoff-Puffer C gespült. Die Elution des Proteins erfolgte mit Harnstoff-Puffer D und E. Hierbei wird das Protein durch einen pH-Gradienten (Protonierung der Histidinseitenketten) eluiert (Qiagen, 1997). Anschließend wurden die Fraktionen zur Kontrolle auf einem SDS-

Gel aufgetragen und die gewünschten Fraktionen gegen den dargestellten Dialysepuffer dialysiert.

Harnstoff-Puffer B	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 8,0)
Harnstoff-Puffer C	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 6,3)
Harnstoff-Puffer D	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 5,9)
Harnstoff-Puffer E	8 M Harnstoff 10 mM Tris/HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5)

4.2.6. Rückfaltung von denaturierend aufgereinigten Proteinen:

Zur Rückfaltung von PCPs- und Sfp-Mutanten durch langsame Entfernung des Harnstoffes und zur Einstellung definierter Pufferbedingungen wurden die Proteinproben, die durch die denaturierende Reinigung über Ni-NTA gewonnen wurden (siehe 4.2.5), gegen einen Dialyse-Puffer dialysiert. Zunächst wurde bei RT die Protein-Lösung dreimal gegen das 100-fache Volumen für jeweils 4-5 h dialysiert. Danach wurde dreimal gegen ein je 100-faches Volumen für 2-3 h bei 4 °C dialysiert.

4.2.7. Aufreinigung mit Strep-Tactin Säulen

Das Strep-Tactin (Strep-Tag) ist eine künstlich hergestellte Peptidsequenz (WSHPQFEK), die von dem natürlich Vorkommenden Streptavidin hergeleitet wurde. Der Strep-tag besitzt eine höhere Affinität zu genetisch verändertem Streptavidin, dem sogenannten Strep-Tactin (IBA) (K_a ca. 10^{15} M^{-1}), als zu normalem Streptavidin (K_a ca. 10^{13} M^{-1}). Das rekombinante Protein mit C-terminalen Strep-tag bindet an die immobilisierte Strep-Tactin-Sepharose und wird so durch einen einzigen Aufreinigungsschritt von allen anderen Proteinen getrennt (IBA, 2002). Das gebundene Protein wurde nach einigen Wasch-Schritten (Puffer E) mit geringen Mengen an Desthiobiotin von der Matrix freigesetzt. Desthiobiotin bindet analog zu Biotin, dem natürlichen Liganden von Streptavidin. Im Gegensatz zu Biotin ist die Bindung von Desthiobiotin reversibel, was eine Regeneration der Säule ermöglichte. Desthiobiotin kann mit HABA (4-hydroxy azobenzen-2-carboxyl säure von der Säulenmatrix abgelöst werden.

Die Regeneration lässt sich dabei gut anhand einer Farbreaktion von HABA auf der Säule verfolgen. HABA wiederum lässt sich durch eine pH-Änderung von der Säulematrix verdrängen, so dass diese nun wieder vollständig regeneriert ist.

Die 1 mL Strap-Tactin Säulen wurden mit 2 mal 2,5 mL Puffer W äquilibriert und nachfolgend 1-3 mL der Zellsuspension aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig aufgetragen war, wurde 5 mal mit 1 mL Puffer W gewaschen und das Eluat in 1 mL Fraktionen aufgefangen. Darauf wurden 6 mal 0,5 mL Puffer E der Desthiobiotin enthält auf die Säule gegeben und 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Der Hauptteil des gereinigten Proteins befand sich jeweils in den Fraktionen 3-5. Die Säule wurde zur Regeneration 3 mal mit 5 mL Puffer R gespült, was einen Farbumschlag nach rot zur Folge hatte. Nach Spülen mit 2 mal 4 mL Puffer W konnte mit der Säule eine erneute Aufreinigung durchgeführt werden.

Puffer W	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer E	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA

4.3. Biochemische Untersuchungen²

4.3.1. Priming Assay für die Aktivität der PPTase (Phosphopantetheinylierungsassay für CP)

Um die Aktivität der Phosphopantetheinyl-Transferase des wt und der Sfp-Mutanten zu bestimmen, wurde der von Lambalot et al. beschriebene *in vitro* Phosphopantetheinylierungsassay für CPs (Priming –Assay) verwendet (Lambalot *et al.*, 1996). Diese Modifikation kann sowohl mit der [³H]-markierten-4'-Phosphopantetheinyl-Gruppe von CoA (40 Ci/mmol, 0,95 mCi/mL) über die Messung von gebundener Radioaktivität an dem Serinrest des CPs verfolgt werden, als auch mit nicht markiertem CoA mittels der HPLC.

² Alle Biochemische Messungen wurden dreifach bestimmt.

Ein typischer Reaktionsansatz für die HPLC-Methode beinhaltete 100 pmol CP, 25 nM PPTase, 10 mM MgCl₂ und 100 µM CoA. Bei dem radioaktiven Ansatz wurden 200 mM CoA mit 20 µM [³H]-CoA zusammen gemischt. Die Reaktionen wurden mit Priming-Assay-Puffer auf jeweils 100 µL aufgefüllt. Für die bessere Reproduzierbarkeit und zur Minimierung der Fehler wurden die einzelnen Reaktanten in Mixen zusammen pipettiert und dann entsprechend vereinigt (Protein, MgCl₂ und CoA). Die PPTase wurde zum Schluss zugegeben.

Priming-Assay –Puffer für Sfp	75 mM MES/HCl (pH 6,0) 250 mM NaCl 100 µM DTT
Priming-Assay –Puffer für AcpS	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 250 mM NaCl 100 µM DTT

Die Reaktion wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

Im Falle der radioaktiven Aufarbeitung wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 800 µL eiskalter TCA (10%) abgestoppt. Als Fällungshilfe wurden 15 µL einer 25 mg/mL BSA-Lösung zugegeben. Das Präzipitat wurde 10 min auf Eis inkubiert, anschließend 20 min bei 4 °C mit 16000 g zentrifugiert und dann 3 mal mit 800 µL eiskalter TCA (10%) gewaschen. Das Pellet wurde in 180 µL konzentrierter Ameisensäure aufgenommen und in eine 4 mL Polypropylenmessflasche mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit überführt. Anschließend wurde die Probe in einem Szintillationszähler vermessen. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne MgCl₂ bzw. ohne PPTase verwendet.

Bei der Verwendung der HPLC- Methode wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

Der 100 µL Reaktionsansatz wurde mit 140 µL Acetonitril abgestoppt, 10 min bei 16000 g/RT zentrifugiert und anschließend 100 µL des klaren Überstandes auf die HPLC-Säule injiziert (siehe 4.4.2.2).

4.3.2. Assay für die Aktivität der A-Domäne (ATP-PP_i-Austauschassay)

Um die Aktivität der A-Domänen aller aufgereinigten Proteine zu bestimmen wurde der von Lee & Lipmann (Lee *et al.*, 1975) beschriebene ATP-PP_i-Austauschassay verwendet. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit der A-Domänen unter ATP-Hydrolyse und Pyrophosphatabspaltung eine Substrataminosäure als Adenylat zu aktivieren. Da die

Aktivierungsreaktion reversibel ist, wird Pyrophosphat bei der Rückreaktion in ATP eingebaut (Stachelhaus and Marahiel, 1995b). Das ATP wird selektiv von Aktivkohle absorbiert, durch die große Affinität des Orthophosphates gegenüber dem Pyrophosphat zur Aktivkohle. Bei der Verwendung von [^{32}P]-PP_i ist der Grad der Inkorporation in ATP direkt proportional zur enzymatischen Aktivität des Proteins. Als Blindwerte für diese Reaktion wurden Reaktionsansätze ohne Aminosäure bzw. mit einer nicht kognaten Aminosäure durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltete 20 pmol Enzym. Zu den Reaktionsansätzen wurden 0,15 μCi [^{32}P] gegeben. Die Reaktionen wurden in 100 μL Endvolumen durchgeführt. Aufgefüllt wurde mit PP_i-”Assay”-Puffer. Für die bessere Reproduzierbarkeit und zur Minimierung von Pipettierfehlern wurden die einzelnen Reaktanten in Mixen zusammen pipettiert und dann in gewünschter Weise vereinigt (Protein und Aminosäure waren in verschiedenen Mixen und wurden zum Schluss zusammen gegeben). Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 800 μL eiskaltem „Terminationsmix“ gestoppt und die Aktivkohle abzentrifugiert (1 min, 4°C bei 16000 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet durch Resuspendieren in 1 mL ddH₂O und anschließender Zentrifugation 2 mal gewaschen. Das Pellet in 1 mL ddH₂O aufgenommen, in eine 4 mL Polypropylenmeßflasche überführt, und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler vermessen.

„Terminationsmix”	100 mM Natriumpyrophosphat 560 mM Perchlorsäure 1,2 % (w/v) Aktivkohle (NoritA)
PP _i -Assay-Puffer	100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM HEPES, pH 7,9 in ddH ₂ O

4.3.3. Aminoacylierung von PPS-Modulen (Beladungsassay)

In der Reaktionsabfolge der NRPS Module wird das zuvor modifizierte CP mit der zuvor aktivierten AS beladen. Dieser Beladungsvorgang, der die Bindung der AS als Thioester beschreibt kann durch die Verwendung einer radioaktiv markierten AS detektiert werden.

Durch die Präzipitation des beladenen Proteins mit TCA und anschließender Zentrifugation, kann die nicht gebundene Aminosäure ausgewaschen werden. So kann die Aminoacylierungsaktivität überprüft werden (Stachelhaus and Marahiel, 1995b). Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltete 50 pmol CP und 50 pmol der kognaten A-Domäne. In

die Reaktionsansätze wurden außerdem 25 nM PPTase, 120 μ M CoA und 1,25 μ M radioaktiv-markierte Aminosäure zugegeben und mit dem Aminoacylierungsmix auf 100 μ L aufgefüllt. Nach 5 min Präinkubation bei 37°C wurde zu der Mischung 2 mM ATP gegeben. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 5-30 min bei 37 °C inkubiert. Die Aminoacylierungsreaktion wurde durch die Zugabe von 800 μ L eiskalter TCA (10%) und 15 μ L einer 25 mg/mL BSA-Lösung abgestoppt. Durch die Zugabe von TCA (10%) wurde das Protein mit der als Thioester gebundenen Aminosäure präzipitiert. Das Präzipitat wurde zuerst 10 min auf Eis inkubiert, anschließend 20 min bei 4 °C mit 16000 g zentrifugiert und dann 3 mal mit 800 μ L eiskaltem TCA (10%) gewaschen. Das Pellet wurde in 180 μ L konz. Ameisensäure aufgenommen und in eine 4 mL Polypropylenmeßflasche mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit überführt. Anschließend wurde die Probe in einem Szintillationszähler vermessen. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne MgCl_2 , ohne ATP oder ohne PPTase verwendet.

Aminoacylierungsmix	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM DTT 10 mM MgCl_2 250 mM NaCl
---------------------	--

4.3.4. Epimerisierungsassay

Um die Aktivität der Epimerisierungs-(E) -Domäne in Modulen zu bestimmen, wurde der von Stachelhaus et al. beschriebene *in vitro* Epimerisierungsassay verwendet (Stachelhaus and Walsh, 2000). Hierbei wurde die Substrataminosäure zu der Proteinlösung gegeben. Nach der Aktivierung wurde die Aminosäure kovalent als Thioester an die prosthetische Gruppe der CP gebunden. Die Reaktionen wurden zu verschiedenen Zeiten abgestoppt. Durch eine anschließende alkalische Hydrolyse, wurde die Abspaltung des Produktes vom Enzymtemplat herbeigeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels chiraler DC-Platten.

Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltetete 500 nM des Moduls, 25 nM Sfp, 120 μ M CoA und 1,25 μ M [^{14}C]-L-Phe oder [^{14}C]-D-Phe. Es wurde mit Aminoacylierungsmix auf 100 μ L aufgefüllt. Nach 15 min Präinkubation bei 37°C wurde zu der Mischung 2 mM ATP gegeben. Die Reaktion wurde zu definierten Zeitpunkten nach weiterer Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 1 mL eiskalter 10% TCA abgestoppt. Anschließend wurde 15 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4 °C zentrifugiert (16000 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Pellet zweimal mit je 1000 μ L eiskalter TCA gewaschen. Durch anschließendes Waschen mit je 1 mL $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$ [3:1 (v/v)] und mit 1 mL Et_2O wurden

TCA-Reste abgetrennt. Nach dem Trocknen der Pellets wurden die [^{14}C]-markierten enzymgebundenen Aminosäuren durch Zugabe von 100 μL einer 100 mM KOH-Lösung bei einer 10 minütigen Inkubation bei 75 °C im Heizschüttler (1400 rpm) abgespalten (Thioesterspaltung). Zu der Reaktionslösung wurde 1 mL Methanol gegeben, vortexiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min/16000 g/ 4 °C) wurde der Überstand in neue Gefäße überführt und im Vakuum die Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurden die erhaltenen Pellets in 20 μL 50% Ethanol (v/v) resuspendiert und auf chirale DC-Platten (HPTLC-Fertigplatten CHIR, Merck) aufgetragen, die mit einem Lösemittelgemisch aus Acetonitril/Methanol/Wasser [4:1:1 (v/v)] entwickelt wurden. Die Radioaktivität wurde direkt mit einem zweidimensionalen Radioaktivitätsscanner unter Verwendung der mitgelieferten Software (RITA) quantifiziert. Die Enantiomerenreinheit für die verwendete [^{14}C]-D-Phe und [^{14}C]-L-Phe Aminosäure beträgt 95% bzw. 99%.

4.3.5. Kondensierungsassay:

Um die Kommunikation von der Kondensierungs (C) -Domäne im Modul mit dem PCP-Mutanten zu bestimmen, wurden Modellsysteme von Mootz *et al.* und Linne *et al.* verwendet (Linne and Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2000a). In beiden Systemen wurde das Initiationsmodul TycA mit TycB1 (ProCAT) bzw. dem Fusionsprotein TycB1-TycC6-Te (ProCAT-LeuCAT-Te) benutzt. Alle Proteine stammen aus dem Tyrocidin-Biosynthesesystem. Im Falle der Inkubation von TycA mit TycB1 wird ein lineares Dipeptid gebildet, das sich in einer vom Enzym nicht katalysierten Reaktion unter Zyklisierung als D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) unkatalysiert abspaltet. Die Bildung des zyklischen Dipeptides DKP wurde mittels HPLC-MS verfolgt. Im zweiten Fall wurde sowohl das Dipeptid DKP (Diketopiperazin), als auch das Tripeptid (D-Phe-L-Pro-L-Leu) gebildet, welches durch die C-terminal fusionierte Thioesterasedomäne katalytisch abgespalten wird. Die Detektion erfolgte ebenfalls mittels HPLC-MS.

4.3.5.1. DKP-Produktsassay

Der DKP-Produktsassay basiert auf einem von Linne *et al.* (Linne and Marahiel, 2000) beschriebenen Verfahren und wurde in der vorliegenden Arbeit wie folgt modifiziert:

Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltete 50 nM TycA bzw. hTycA, 1,25 μM TycB1 (ProCAT) bzw. deren Mutanten, 2,5 mM L oder D-Phe, 2,5 mM L-Pro, 25 nM PPTase (AcpS oder Sfp) und 200 μM CoA. Mit Kondensierungs-Puffer wurde auf 100 μL aufgefüllt.

Nach 15 min Präinkubation bei 37 °C wurde durch Zugabe von 10 mM ATP zu dieser Mischung die Reaktion gestartet und weiterhin bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 0,4 mL Butanol/Chloroform [4:1 (v/v)] wurde die Reaktion gestoppt und die organische Extraktion eingeleitet. Nach Zugabe von 200 µL H₂O wurde das Gemisch 20 s vortexiert. Die Phasen wurden durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 16000 g getrennt. Die organische Phase wurde in eine frisches Reaktionsgefäß transferiert. Diese Extraktion wurde ein zweites Mal mit 0,4 mL Butanol/Chloroform [4:1(v/v)] durchgeführt und beide organischen Phasen vereinigt. Anschließend wurde die vereinigte organische Phase in gleicher Weise zweimal mit je 0,3 mL H₂O gewaschen, wobei nach der Phasentrennung jeweils die organische Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Die organische Phase wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und das Pellet in 50 µL 10% Methanol (+ 0,05% HCOOH (v/v)) gelöst. Die Lösung wurde nun durch HPLC-MS auf DKP untersucht (siehe 4.4.2.1).

Kondensierungs-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM DTT 10 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl
-----------------------	--

4.3.5.2. Tripeptid-Produktsassay

Der Tripeptid-Produktsassay (D-Phe-L-Pro-L-Leu) basiert auf einen von Mootz et al. beschriebene Verfahren (Mootz *et al.*, 2000a). Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltete 50 nM TycA bzw. hTycA, 1,25 µM TycB1-TycC6-Te (ProCAT-LeuCAT-Te) bzw. deren Mutanten, 2,5 mM L oder D-Phe, 2,5 mM L-Pro, 2,5 mM L-Leu, 25 nM PPTase (AcpS oder Sfp) und 200 µM CoA. Es wird mit Kondensierungs-Puffer auf 100 µL aufgefüllt. Nach 15 min Präinkubation bei 37 °C wurde zu dieser Mischung 10 mM ATP gegeben und die Reaktion dadurch gestartet. Die Reaktion wurde zu definierten Zeitpunkten nach weiterer Inkubation bei 37 °C durch die Zugabe von 0,4 mL Butanol/Chloroform [4:1 (v/v)] gestoppt und die organische Extraktion eingeleitet (siehe DKP-Produktsassay 4.3.5.1).

4.4. Biophysikalische Untersuchungen

4.4.1. Reversed Phase HPLC-Analyse

Mit Hilfe der HPLC (*high performance liquid chromatography* oder Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) wurde eine Methode entwickelt um die apo- von der holo-

Form der CPs zu trennen. Zusätzlich wurde die HPLC für die Trennung von Dipeptid (DKP, Diketopiperazin) und Tripeptid (D-Phe-L-Pro-L-Leu) eingesetzt.

Zur Auftrennung und Identifizierung wurden die CP-Proben in Dialysepuffer und die Peptide in 10% Methanol auf eine HPLC-Säule (C18, Nucleosil 3 mmx 250 mm, Porengröße: 120 Å, Partikelgröße: 3 µm; *Macherey&Nagel*) injiziert. Zur Analyse des DKP-Produktassays wurde eine HPLC-Säule (C18, Nucleosil 3 mm x 70 mm, Porengröße: 120 Å, Partikelgröße: 3 µm; *Macherey&Nagel*.) Säule verwendet. Das Elutionsprofil wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgenommen.

4.4.2. HPLC-ESI-MS

Die Massenspektren konnten während der Auftrennung mit der HPLC durch ein ESI-Interface (*elektrospray ionisation, Analytica of Branford Inc.*) an das HPLC gekoppelte Massenspektrometer (HP LC-MSD Series1100 System mass spectrometer, *Hewlett Packard*) aufgenommen werden (online Messung). Das Elektrosprayionisierungs-Interface (ESI-Interface) überführt die solvatisierten Ionen in die Gasphase. Ionen werden dadurch erzeugt, dass die gelöste Probe in einem elektrischen Feld versprüht wird (*Elektrospray*). Die entstandenen Ionen werden in einem Hochvakuum mit Hilfe eines Quadrupol-Stabsystems getrennt und mit einem Elektronen-Multiplier detektiert (Lottspeich and Zorbas, 1998). Diese Methode stellt neben der MALDI-TOF Analyse eine geeignete Methode für die Bestimmung der Masse von Proteine dar. In beiden Methoden wird durch Verwendung besonders sanfter Ionisierungsmethoden die Fragmentierung der Proteine vermieden. Abhängig von der Molekülgröße entstehen einfach oder mehrfach geladene Ionen. Bei kleineren Molekülen (bis zu etwa 1000 Dalton) entstehen vorwiegend einfach geladene $[M+H]^+$ Ionen. Bei einigen Substanzklassen kommt es zu einer Adduktbildung mit den in der Lösung vorhandenen Ionen. In diesem Fall entstehen dann statt der protonierten Quasimolekülonen Addukte mit Ammonium-, Natrium- oder Kaliumionen. Für eine detailliertere Beschreibung der verwendeten Analysemethoden zu erhalten, sei der Leser auf weiterführende Literatur hingewiesen, wie z.B. Bioanalytik (Lottspeich and Zorbas, 1998)

4.4.2.1. Di- und Tripeptidanalyse

Für die Analyse der Produkte mittels HPLC wurden die Proben (siehe 4.3.5.1. und 4.3.5.2) in 200 µL Laufmittel A/B (90:10) aufgenommen. Davon wurden 30 µL auf die Säule injiziert (für die Probenvorbereitung siehe). Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Folgender Gradient wurde bei einer Flussrate von 0,30 mL/min und 25°C Säulentemperatur angelegt:

HPLC-Gradient:	0 min	10 % Solvent B
	1 min	30 % Solvent B
	20 min	100 % Solvent B
	30 min	100 % Solvent B
	35 min	10 % Solvent B
	50 min	10 % Solvent B

Für die Analyse von DKP mittels HPLC (über Grom-Sil 120-ODS-4-HE 3 mm x 60 mm, GROM Herrenberg) wurden die Proben in 50 µL Laufmittel A/B (70:30) aufgenommen. Davon wurden 30 µL auf die Säule appliziert. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Hierbei wurde isokratisch, mit einer Flussrate von 1,0 mL/min und 23 °C Säulentemperatur gearbeitet. Diese Methode stellt neben der erste Methode eine schnelle Trennung für die DKP Isoformen D-L- (5,5 min) und L-L-DKP (6,5 min) dar.

Laufmittel A	ddH ₂ O mit 0,05 % (v/v) HCOOH
Laufmittel B	Methanol mit 0,05 % (v/v) HCOOH

Bei dem Massespektrometer wurde folgenden Parameter eingestellt:

Massenbereich von 100-600 m/z , Kapillarspannung von 4500 V, Beschleunigungsspannung im Eingangsbereich (Kapillarspitze) 20 V, Fragmentorspannung 240 V, Trockengastemperatur 350°C, Trockengasfluss 10 L/min (Stickstoff) und Zerstäuberdruck 25 bar .

4.4.2.2. Chromatographische Analyse von apo- und holo-CPs

Für die Trennung der apo-und holo-CPs mittels HPLC häufig wurden jeweils 50µL der Proben (siehe 4.3.1) mit 70 µL Laufmittel B verdünnt. Davon wurden 100 µL auf die Säule appliziert. Die Detektion erfolgt bei 220 nm. Für die Trennung von apo- und holo-PCP wurde zwei Methoden entwickelt (HPLC-Gradient Methode 1 und 2) und für ACP wurde Methode (HPLC-Gradient Methode 3) entwickelt. Am Anfang wurde mit dem Methode 1 gearbeitet, im laufende der Zeit wurde zweite Methode Entwickelt. Die Charakterisierung der Mutanten

wurden mit Methode 2 durchgeführt.

HPLC-Gradient Methode 1 für PCP und hPCP:

0 min	40 % Solvent B
30 min	95 % Solvent B
35 min	95 % Solvent B
36 min	40 % Solvent B

Flussrate 0,5 mL/min
Temp 40°C
Stop Time : 45 min
Solvent A: H₂O + 0,1%TFA
Solvent B: ACN + 0,1%TFA

HPLC-Gradient Methode 2 für PCP und hPCP:

0 min	40 % Solvent B
15 min	57,3 % Solvent B
16 min	95 % Solvent B
18 min	95 % Solvent B
20 min	40 % Solvent B
30 min	40 % Solvent B

Flussrate: 0,9 mL/min
Temp: 45°C
Stop Time : 30 min

Laufmittel A	bdH ₂ O mit 0,05 % (v/v) TFA
Laufmittel B	Acetonitril mit 0,05 % (v/v) TFA

Für die Trennung von apo- von holo-ACP wurde folgende Methoden entwickelt:

HPLC-Gradient Methode 3 für ACP:

0 min	5 % Solvent B
4 min	60 % Solvent B
28 min	95 % Solvent B
30 min	95 % Solvent B
35 min	5 % Solvent B
45 min	5 % Solvent B

Flussrate 0,3 mL/min
Temp 40°C
Stop Zeit : 45 min
Solvent A: H₂O + 0,1%TFA
Solvent B: Methanol + 0,1%TFA

Bei dem Massespektrometer wurden folgenden Parameter eingestellt:

Massenbereich von 100-2500 *m/z*, Kapillarspannung von 4500 V, Beschleunigungsspannung im Eingangsbereich (Kapillarspitze) 70 V, Fragmentorspannung 240 V, Trockengas temperatur 350°C, Trockengas-Flussrate 13 L/min und Zerstäuberdruck 50 bar.

4.4.3. MALDI-TOF

Bei der MALDI-TOF (*Matrix-Assisted-LaserDesorption-Ionization-Time of Flight*) Analyse werden die Proben auf einem metallischen Probenhalter mit einem 1000 bis 10000 fachen molaren Matrixüberschuss Sinapinsäure (3,5-Methoxy-4-Hydroxy Zimtsäure ca. 220 Da) gemischt (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Sinapinsäure dient zur Absorption der Laserenergie im Matrix/Analyt-Kokristall bei Laserwellenlängen von 266, 337 und 355 nm. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung weniger Nanosekunden ausgesetzt.

Dabei werden neben Matrixmolekülen auch Proteinmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Durch ein hohes elektrisches Feld werden im Hochvakuum die Proben in Richtung des Analysators beschleunigt. So wird mit Hilfe der erhaltenen Flugzeit auf die theoretische Masse zurückgerechnet. Die MALDI-TOF Spektren enthalten hauptsächlich einfachgeladene Molekül-Ionen, bei großen Molekülen können oft auch mehrfach geladene Monomere $[M+2H]^{2+}$ und $[M+3H]^{3+}$ und bei hohen Analyt-Konzentrationen Dimere $[2M+H]^+$ beobachtet werden. Die MALDI-TOF Analyse wurde stets verwendet um die Masse von Proteinen zu bestimmen, die für Kristallisationsansätze oder für NMR Untersuchungen verwendet wurden. Um hierbei bessere Ergebnisse zu erzielen wurden die Proben vorher 60 min bei RT mit ddH₂O auf einem Nitrocellulose Filter Blättchen (0,025 µm Porendurchmesser, *Millipore, Molsheim*) dialysiert, da eine hohe Salz- und Detergentienkonzentration die Messung beeinträchtigen kann.

Der Tropfen auf dem Metallteller bestand aus 2 µL gesättigter Sinapinsäure und 2 µL Proteinlösung. Nach der Kristallisation der Probe wurde die Masse der Proteine bestimmt. Hierbei wurde folgenden Einstellungen beim Gerät vorgenommen:

Für Proteine mit Molekulargewichten von 8-50 kDa: Beschleunigungsspannung 20000 V, Extraction delay Zeit 20000 ns und ein Massenbereich von 600- 60000 Da.

Für Proteine mit Molekulargewichten von 60-150 kDa: Beschleunigungsspannung 25000 V, Extraction delay Zeit 500 ns und ein Massenbereich von 50000- 260000 Da.

4.4.4. Circular dichroismus (CD)

Circular dichroismus (CD) ist eine der schnellsten Methoden die zur Konformationsanalyse von Peptiden und Proteinen eingesetzt werden kann (Lottspeich and Zorbas, 1998). Der CD beruht auf der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen wie z.B. AS. Bei CD-Messungen wird die Absorption des polarisierten Lichtes in Abhängigkeit von der Wellenlänge untersucht. Hierbei werden die rechts- und die links- zirkular polarisierten Lichtwellen zu linear polarisiertem Licht überlagert. Die Differenz des molaren Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$) wird als Elliptizität θ gemessen:

$$\theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$$

d: die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe

Da sich die Werte für θ um 10^{-3} [deg cm²/dmol] oder weniger befinden, wird bei der Messtechnik zunächst durch einen Monochromator Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugt, welches dann zu linear polarisiertem Licht umgewandelt wird.

Die Messtechnik des CDs wurde in dieser Arbeit zur Analyse von Sekundärstrukturen der Proteine verwendet welche zu diesem Zweck bei 260 bis 190 nm gemessen wurde. Aufgrund der Chiralität der Peptidbindung kann man die Anteile von α -Helices- und β -Faltblatt-Strukturen der Proteine bestimmen.

Rechtshändige α -Helices liefern bei Wellenlängen von $\lambda=222$ nm einen Übergang von n auf π^* , was zu einer negativen CD-Bande führt. Der Carbonyl- π auf π^* -Übergang resultiert bei 192 nm in einer negativen und bei 207 nm in einer positiven CD-Bande. Dagegen liefert die antiparallele β -Faltblattkonformation bei $\lambda=215$ bis 220 nm ein Minimum (π auf π^*) und bei 195 nm ein Maximum. Die ungeordnete Konformation eines Proteins liefert ebenfalls charakteristische CD-Spektren.

Die CD-Spektroskopie eignet sich für den Vergleich homologer Proteine zueinander oder zur Optimierung von pH-Titrationsen, Messungen bei verschiedenen Temperaturen oder in verschiedenen Puffern (z.B. bei NMR-Messungen) oder erlaubt Vorhersagen von Sekundärkonformationen von unbekannten Proteinen (Kelly and NC., 1997; Lottspeich and Zorbas, 1998).

4.4.5. BIAcore

Zur funktionellen Untersuchung der Sfp-Mutanten mit CoA und PCP wurde die BIAcore Technologie verwendet. BIAcore Systeme nutzen die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (*Surface plasmon resonance*, SPR) zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen (Rich and DG., 2000). Dabei wird die Absorption von Licht an einer dünnen Metallschicht, die sich an einer Grenzfläche zwischen einem Prisma und einer flüssigen Phase befindet, gemessen. Die Resonanzbedingung hängt vom Brechungsindex des Mediums in der Nähe der Metallschicht ab. Dieser Brechungsindex ändert sich, wenn sich z.B. Makromoleküle auf der Oberfläche des Sensors abscheiden. Diese Änderung kann zeitaufgelöst analysiert werden (Abb. 4.1).

Zur eigentlichen Messung wird dem an einem Sensor Chip immobilisierten Molekül der zu testende Reaktionspartner mittels eines Fließinjektionssystems zugeführt. Die erlaubt eine quantitative und zeitaufgelöste Messung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Makromolekülen mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 Da.

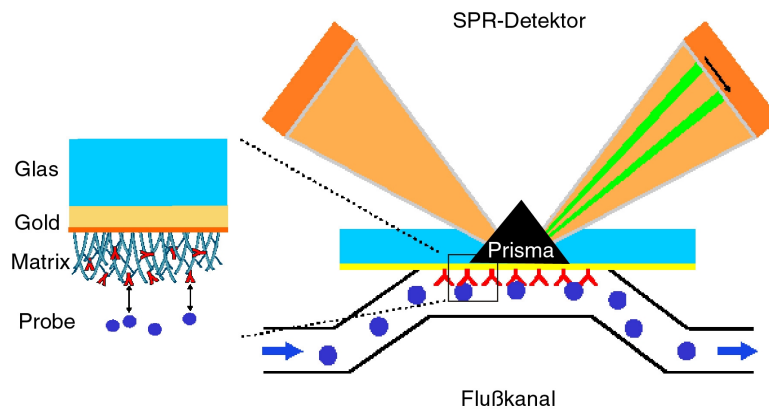


Abb. 4.7: SPR-Detektion in einem BIAcore-System.

Ein Fächer polarisierten Lichtes passiert ein Prisma und wird an der Grenzfläche zur flüssigen Phase unter der Bedingung der Totalreflektion fokussiert. Eine abklingende Welle dringt in die flüssige Phase ein. Da das Prisma mit einer dünnen Goldschicht überzogen ist, absorbieren die freien Elektronen der Goldschicht bei einem bestimmten Winkel Energie aus dieser Welle, der vom Brechungsindex des Mediums nahe der Grenzfläche abhängt. Die Goldschicht kann z.B. mit einer Carboxydextran-Matrix oder Ni-NTA modifiziert werden, auf der "Fängermoleküle" mittels chemischer Methoden fixiert werden können (Biacore AB Germany, Freiburg). Ein Ligand, der über das angesprochene Fließinjektionssystem an den gebundenen Makromolekülen vorbeigeleitet wird, kann mit diesen Molekülen interagieren und sich so in der Matrix anreichern, was eine Verschiebung des Resonanzwinkels bewirkt. Bei unspezifischer Bindung wird der Brechungsindex in der Nähe des Sensors weniger beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden Ni-NTA Sensor Chips benutzt. Die Vorteile dieses Chiptyps liegen in der Bindung der Proteine in bestimmten Orientierungen und in der Regenerierbarkeit dieser Chips (Biacore, 1995).

Alle BIAcore Experimente wurden bei 25°C mit konstanter Flussrate von 10 µL/min mit HBS-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) durchgeführt. Der Ni-NTA Chip wurde zuerst mit dem 150 µL LM1 (0,5 % SDS) und dann mit 150 µL LM2 (50 mM Glycin, pH 9,5) regeneriert. Anschließend wurde auf den Chip nach einander mit 100 µL NaOH-Lösung (10 mM) und 100 µL EDTA-Lösung (500 mM) zum Reinigen des Chips verwendet und 100 µL NiCl₂-Lösung (10 mM) zum Auftragen der Chip aufgetragen anschließend wurde 60 µL der Protein z. B. PCP (15 µM) aufgetragen.

4.4.6. 3D-Strukturaufklärung

Zur 3D-Strukturaufklärung von NRPS-Domänen auf atomarem Niveau in dieser Arbeit wurde die Methode der Röntgenstrukturanalyse sowie der NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die Röntgenstrukturanalyse beschränkt sich auf die Untersuchung von Molekülen in Kristallen, die oft unter großem Aufwand gezüchtet werden müssen. Dagegen kann die NMR-Spektroskopie auf alle drei Aggregatzustände angewandt werden, wobei die Analyse in Lösung für Biomakromoleküle von besonderer Bedeutung ist (Lottspeich and Zorbas, 1998). Zusätzlich zur Strukturaufklärung können auch zahlreiche zeitabhängige Phänomene wie intramolekulare Dynamik, molekulare Erkennungsmechanismen oder Reaktionskinetiken von Proteinen untersucht werden (Wüthrich, 1986). Allerdings liegt die Obergrenze für die Masse der beobachtbaren Moleküle mit den derzeitigen Methoden bei etwa 30 kDa, so dass die NMR-Spektroskopie bei kleineren Makromolekülen eine Erweiterung zur Röntgenstrukturanalyse ist (Wüthrich, 1998), mit deren Hilfe die Strukturen von NRPS-Domänen aufgeklärt werden können.

4.4.6.1. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Technik der Röntgenstrukturanalyse setzt voraus, dass die zu messenden Kristalle Einkristalle sind. Diese werden mit der "hanging drop vapour diffusion"-Methode gezüchtet, bei der eine Protein/Präzipitant-Lösung gegen eine Reservoirflüssigkeit equilibriert wird, so dass die Konzentration von Protein und Präzipitant langsam ansteigt. Hat man die richtigen Bedingungen gefunden (durch Variation von Protein Konzentration, pH-Wert der Lösung, Art des Präzipitanten, Salzgehalt oder andere Zusatz anderer Additiva, Temperatur etc.)(McPherson, 1990), bilden sich Kristalle mit einer Größe von typischerweise 0,1 bis 1 mm. Die Kristalle werden dann in den Röntgenstrahl gebracht und die gestreuten Röntgenstrahlen werden gesammelt. Der Kristall wird während der Messung gedreht (jeweils um 1° bis zu 120° und jeweils 10 min gemessen), da das Diffraktionsmuster eines dreidimensionalen Gitters (des Kristalls) ein ebenfalls dreidimensionales Muster formt, das vollständig sein muss um die Struktur des Proteins lösen zu können. Die Kristalle werden üblicherweise auf die Temperatur von -180°C abgekühlt um Strahlenschäden während der Datensammlung zu vermeiden.

Für die Röntgenstrukturanalyse sind mehrere Schritte erforderlich: Kristallisation, Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten, Bestimmung der Phase und Interpretation der Elektronendichte.

4.4.6.1.1. Kristallisation

Zur Kristallisation von NRPS-Domänen wurde nach dem „hanging drop“-Dampf-Diffusions-Verfahren gearbeitet. In das Reservoir wurden bei NRPS-Modulen jeweils 750 μL und bei den übrigen Proteinen 500 μL Mutterlösung pipettiert. Der Tropfen zur Kristallisation bestand aus 1,5 μL Reserviörlösung und 1,5 μL Proteinlösung.

Diese Mischung wurde mit der Reserviörlösung in einem separaten Tropfen gemischt. Als Screening Methode diente ein von Hampton Research entwickelter Screen (Hampton Screen, Hampton-Research, USA) und zusätzlich ein auf der Matrix von Jancarik und Kim (Jancarik and Kim, 1991) basierendes abgewandeltes Raster. Diese beiden Screening Verfahren umfassten 198 verschiedenen Bedingungen und Kombinationen der oben genannten Variablen. Eine Auflistung der verschiedenen Bedingungen findet sich im Anhang 8.3.

Zusätzlich zu den beiden Screening Methoden wurden klassische Methoden verwendet (Ammonium Sulfat, Di Ammonium Tartrat, Polyethylenglykol (PEG) 1000, 6000 und 8000, Lithium Sulfat, 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD), Kombination von PEG 6000 mit LiCl, Natrium Chlorid alle in pH-Abhängigkeit (pH 4-10) durchgeführt (McPherson, 1990).

4.4.6.1.2. Aufnahme von Röntgenbeugungsdaten

Als Strahlungsquelle wurde eine Drehanode aus Kupfer der Firma RIGAKU verwendet. Die Spannung der Röntgenröhre betrug 50 kV bei 100 mA. Die Cu-K α Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) wurde durch Nickel-Platin-Doppelspiegel monochromatisiert. Als Detektor dient ein RAXIS-IV Bildplattensystem (*image plate*) mit zwei Bildplatten zur Aufnahme der Beugungsbilder. Der Abstand zwischen Kristall und Flächendetektor betrug bei allen Messungen 100 Millimeter. Das Röntgengerät wurde durch die UNIX-Software RIGAKU RAXIS Control Program MSC Release Version 4.3.1 angesteuert. Die Aufnahmezeiten für ein Beugungsbild betrugen 10 Minuten. Dabei wurde der Kristall für eine Aufnahme jeweils um 1° gedreht und bis 180° gemessen. Die Proteinkristalle wurden bei – 180°C vermessen, da bei tiefen Temperaturen der Schaden am Kristall durch die Strahlung minimiert wird. Dazu wurde ein geeigneter Kryopuffer (30% Glycerol mit Kristallisationspuffer) verwendet. Dieser Kryopuffer wurde dann unter Tiefsttemperaturbedingungen auf seine Gefrierbeständigkeit getestet. Im Falle dass der Kryopuffer nicht geeignet war, wurde Paratone-N verwendet. Der Proteinkristall wurde dann zur Messung mittels einer Nylonschleife in diesen Puffer transferiert und so schnell wie möglich in den Stickstoffstrahl der Kälteapparatur gebracht (oder nachdem transferieren auf dem Nylonschleife wurde zuerst im Flüssige Stickstoff die Lösung eingefroren und dann in den Stickstoffstrahl der Kälteapparatur angebracht). Dabei

sollte der Tropfen ohne Wasserkristallbildung einfrieren. Auf dem sogenannten Goniometerkopf wurde der Kristall mittels einer Vergrößerungsoptik zentriert.

4.4.6.1.3. Interpretation der Elektronendichte

Die Datenauswertung erfolgt in der Regel in drei Schritten (1) Datenreduktion, (2) Strukturlösung und (3) Datenverfeinerung.

Bei der Datenreduktion wird nach der Bestimmung der Elementarzelle die Intensität der Reflexe durch das Indexieren mit den Miller Indices bestimmt. Jedem Reflex kann so seine integrierte Intensität ($I_{h,k,l}$) zugeordnet werden. Die für die Strukturlösung benötigten Amplituden der Strukturfaktoren $|F(hkl)|$ lassen sich direkt aus diesen integrierten Intensitäten errechnen (die Intensitäten sind proportional zum Quadrat der Strukturfaktoren). Mit dem Erhalt dieser Rohdaten ist die Datenreduktion beendet. Die Datenreduktion erfolgte mit dem Programm DENZO das „*global refinement*“ (Skalierung und Zusammenführung der mit DENZO erhaltenen Daten) mit dem Programm SCALEPACK (Brünger *et al.*, 1998).

Da die Phase der Sfp-Kristalle von Reuter *et al* bestimmt worden war (mittels *multiwavelength anomalous dispersion* (MAD), konnte mit Hilfe dieser Daten durch Fouriertransformation das Beugungsbild in die Elektronendichte der Kristallstruktur zurückgerechnet werden (Hendrickson *et al.*, 1990), dies erfolgt mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998). Anschließend wurde das Strukturmodell des Proteins an einer Silicon Graphics Workstation mit dem Programm „O“ (Jones *et al.*, 1991) in die erhaltene virtuelle Elektronendichte eingebaut. Das *Refinement* der Struktur erfolgte wieder mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998).

4.4.6.2. NMR -Spektroskopie

Die NMR- (Nuclear Magnetic Resonance) Spektroskopie hat sich in den vergangenen Jahren als Methode für die Strukturaufklärung von Proteinen neben der Röntgenstrukturanalyse etabliert (Wagner, 1997). Sie nutzt die Tatsache, dass die Kerne einiger Atome ein Drehmoment (Spin) aufweisen (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F und ^{31}P). Legt man an solche Kerne, z.B. Wasserstoffatome, ein Magnetfeld an, nehmen die Spins verschieden orientierte Zustände (Dipol-Momente) und damit unterschiedliche Energiewerte an (parallel: niedrige Energie, antiparallel: hohe Energie). Entsprechend kann man in einer Probe, die sich in einem starkem Magnetfeld befindet, durch Anlegen einer elektromagnetischen Strahlung Übergänge induzieren (ca. 10 μs) und so ein Spektrum messen. ^1H ist wegen seiner Empfindlichkeit und Häufigkeit für NMR-Experimente sehr wichtig, Bei Proteinen sind die ^1H -Spektren sehr

kompliziert, da diese mehrere hundert Wasserstoffe besitzt. Das führt dazu, dass eindimensionale NMR-Spektren für die Strukturanalyse nicht geeignet sind. Die zweidimensionale NMR- Technik ermöglicht die Messung der abstandsabhängigen Kopplung von Kernspins nahe beieinander liegender Atome durch den Raum, den Kern-Overhauser-Effekt (NOE, *nuclear Overhauser effect*) in einer als NOESY (NOE *spectroscopy*) bezeichneten Methode, oder die Kopplung der Kernspins von Atomen, die durch kovalente Bindung miteinander verknüpft sind (vollständige Korrelationsspektroskopie (TOCSY, *total correlation spectroscopy*). Durch gezielte Markierung von Proteinen mit ^{13}C und ^{15}N werden neue Signale im NMR-Spektrum hervorgerufen (Lemaster, 1994) und helfen bei der Zuordnung einzelner ^1H -NOE-Signale (zur Protein Markierung siehe). Dieser Vorgang wird auch durch die Kenntnis der Aminosäuresequenz des Proteins unterstützt.

Die dreidimensionale Struktur wird durch die Randbedingungen (wie Chiralität, van der Waals Radien, Bindungslängen und Winkel) und erhaltene Abstandsdaten erzeugt.

NMR-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit als alternative Methode zur Proteinstrukturbestimmung in Kooperation mit Dr. Frank Bernhard (Biozentrum Frankfurt) angewendet. Bevor die Proteine zur NMR-Messung eingesetzt wurden, wurden sie auf ihre Stabilität bei verschiedenen pH-Wert getestet. In der Regel sollten die Messungen im sauren bis neutralen Lösungen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden 200 μg Protein mit Na_3PO_4 -Puffer verschiedener pH-Werte (von 5 bis 8 in 0,25 Schritten) dialysiert und auf 1 mM Endkonzentration eingeeengt und anschließend bei 20, 25 und 30°C für mehreren Stunden bis 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Proteine in geeignetem Puffer mittels CD-Spektroskopie auf Faltung untersucht.

Zur NMR-Messung von NRPS-Domänen wurden 500 μL einer 1 mM Proteinlösung in 50 mM Na_3PO_4 , pH 6,75 aufgenommen. Daten wurden bei 20, 25 und 30°C für jeweils 24 h aufgenommen. Die nicht markierten Proteine wurden auf 450 μL eingeeengt und anschließend mit 50 μL D_2O versetzt.

5. Ergebnisse

Der Ergebnisteil unterteilt sich zum einen in die Mutationsanalyse von Sfp sowie die Untersuchung zur Spezifität der PPTase in Bezug auf CP anhand von Mutationen in PCP. Der dritte Teil befasst sich mit Untersuchungen der Struktur (Kristallisation und NMR-Spektroskopie) von NRPS-Domänen.

5.1. Struktur-Funktionsanalyse in Sfp

5.1.1. Strategie

Der Grundstein zur Strukturanalyse von Sfp wurde bereits in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit in Kooperation mit Dr. Klaus Reuter und Dr. Ralf Ficner gelegt, deren Ergebnisse kurz aufgeführt werden sollen. Die Funktion bestimmter Aminosäure-Reste wurden aus den Daten der Strukturanalyse von Sfp-CoA Kokristallen abgeleitet und anhand biochemischer Charakterisierung von Sfp-Mutanten näher untersucht.

5.1.2. Strukturanalyse von Sfp-CoA Kokristallen

Das Gen *sfp* wurde aus chromosomaler DNA von *Bacillus Subtilis* ATCC 21332 (Surfactin Produzent) amplifiziert, in den pQE60-Vektor kloniert. *E. coli* BL21 (pREP4) wurde anschließend mit dem Konstrukt transformiert. Nach Expression und Reinigung wurden Sfp und Selenomethionin-markiertes Sfp bei 21°C mit 1 mM CoA und MgCl₂ kristallisiert. Die besten Kristalle wurden in 1,0 M Natrium-Formiat und 100 mM Natrium-Acetat (pH 5,0) erhalten. Der Se-Met-Sfp-CoA Kokristall wurde mit eine Auflösung von 1,8 Å und einem R-Faktor von 21,3 % gelöst. Die erhaltenen Kokristalle sind Bipyramiden mit der Raumgruppe P₄₃2₁2 und folgenden Zellkonstanten: $a = b = 65,34$ Å und $c = 150,3$ Å (Mofid *et al.*, 1999; Reuter *et al.*, 1999).

Sfp kristallisierte als Monomer und innerhalb der Struktur wird eine nicht-strenge C₂-Symmetrie (pseudo-zweifach-Symmetrie) beobachtet (siehe Abb. 5.1). Der linke Teil ist um 90° im Vergleich zu dem rechten Teil gedreht. So wird Sfp in zwei Teile unterteilt, die N-terminale Subdomäne (Aminosäuren 1-103) und die C-terminalen Subdomäne (Aminosäuren 104-210). Die beiden Subdomänen werden durch ein 14 AS langes Rückgrat zusammengehalten.

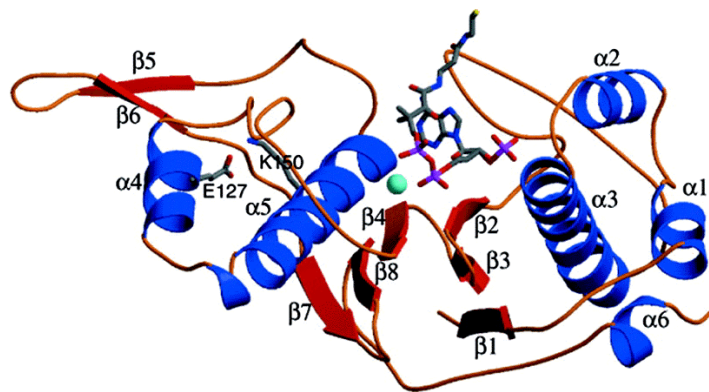


Abb. 5.1: Ribbon-Darstellung von Sfp aus *B. subtilis*. Die N-terminale Subdomäne ist zur C-terminalen Subdomäne um 90° verdreht. Das Mg^{2+} -Ion ist grün dargestellt. Beide Hälften von Sfp sind an der Bindung von CoA beteiligt.

In einer negativ geladenen Tasche auf der Sfp Oberfläche wird CoA mittels seiner Phosphat-Gruppe gebunden. Ein gebundenes Mg^{2+} -Ion in dieser Tasche stabilisiert die negativen Reste von Sfp und koordiniert gleichzeitig die Phosphat-Gruppen von CoA (Reuter *et al.*, 1999). Der Phosphopantetheinyl-Rest von CoA ist am Enzym verankert, deshalb können auch folgenden CoA Derivate wie Acetyl-CoA, Homocysteamin-CoA, Acetonyldethio-CoA, Desulfo-CoA, Benzoyl-CoA und Phenylacetyl-CoA von Sfp als Substrat akzeptiert und auf PCP (SrfB1) übertragen werden (Quadri *et al.*, 1998c). Dagegen stellt 3'-Dephospho-CoA kein Substrat von Sfp dar, da das 3'-Phosphat eine wichtige Voraussetzung für die Bindung und Orientierung des CoA im Sfp spielt (siehe Abb. 5.2).

Die beiden Stickstoffatome des Imidazolrings, die Carbonylgruppe und die Aminogruppe der Hauptkette von H90 bilden Wasserstoffbrücken mit der 3',5'- α -Phosphatgruppe des CoA aus (siehe Abb. 5.2). Das α -Phosphat bindet dabei zum einen an die polare Hydroxyl-Gruppe von S89 (O^{γ}), zum anderen an die ζ -Aminogruppe der K155 Seitenkette. Das α - und β -Phosphat sind mittels eines Mg^{2+} -Ion an Sfp gebunden. Das Mg^{2+} -Ion wiederum wird durch die Reste D107, E109 und E151 koordiniert (siehe Abb. 5.2), ein Wassermolekül dient dabei als sechster Ligand (Reuter *et al.*, 1999).

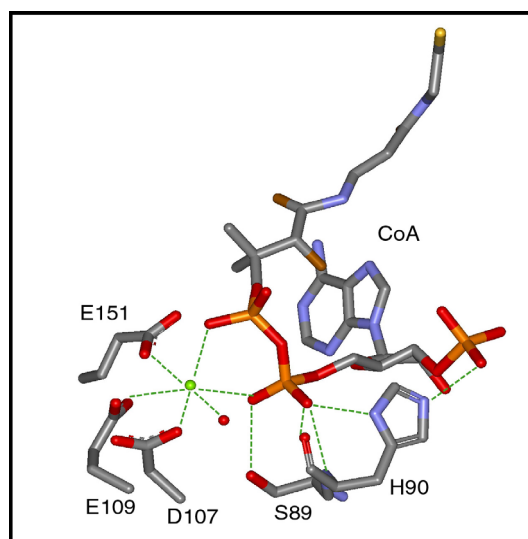


Abb. 5.2: Koordination von CoA in der CoA-bindenden Tasche von Sfp. Das Mg^{2+} -Ion (Grün) ist oktaedrisch von 6 Sauerstoffatomen des D107, E109, E151, dem Pyrophosphat des CoA und Wasser (Rot) umgeben. S89 und H90 bilden mit 5'- α -Phosphat eine Wasserstoffbrücke.

5.1.3. Charakterisierung der posttranslationalen Modifikation von CP mit Sfp

Die Untersuchungen der PPTase Aktivität von Sfp und deren Mutanten unterteilt sich in die Entwicklung der HPLC-Methode zur Trennung von apo- und holo-CP und in die Bestimmung der kinetischen Daten (pH-Wert, CoA-, PCP-, Metallionen-Abhängigkeit) dieser Reaktion.

5.1.3.1. Entwicklung der HPLC Trennungsmethode für apo- und holo-PCP

Für die Bestimmung der kinetischen Daten von Sfp und deren Mutanten und für die posttranslationale Modifikation von PCP oder ACP bzw. hPCP mit nicht radioaktivmarkierten CoA wurde eine neue HPLC-Methode entwickelt.

Lambalot und Mitarbeiter haben in früheren Arbeiten die Trennung von apo- und holo-ACP aus (Fettsäure Synthase von *E. coli*) mittels HPLC beschrieben (Lambalot and Walsh, 1997). Die Trennung erfolgte mit einer C₁₈-Reverse-Phase Chromatographie mit Wasser und Isopropanol als Solvent mit einer Flussrate von 0,5 mL/min durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte keine Trennung von PCP erzielt werden. Durch Variieren der Säulenmaterialien (C₈ oder C₁₈), der Temperatur (von 20-45°C) und der Solventien (Isopropanol, Methanol und Acetonitril) wurde versucht geeignete Bedingungen zur effizienten Trennung von PCP und anderen CP zu erhalten. Die getrennten Peaks wurden zur endgültigen Analyse mittels ESI-MS verifiziert. Es konnte dabei eine eindeutige Trennung von apo- und holo-PCP gezeigt werden. Die verwendete Analyseeinheit konnte nach der Methodenentwicklung als gekoppeltes HPLC-ESI-MS weiter eingesetzt werden. Für die Trennung von apo- und holo-PCP wurden zwei Methoden entwickelt. Beide Methoden sind im Methodenteil (siehe das Kapitel 4.4.2.2) beschrieben.

Bei der HPLC-Gradient Methode 1 betragen die Retentionszeiten für apo- und holo-PCP 11,95 min bzw. 10,67 min. Für die Trennung von hPCP wurde mit dieser Methode eine bessere Trennung erzielt. Hierbei betragen die Retentionszeiten für apo-hPCP 26,1 min und für holo-hPCP 27,7 min.

Da die HPLC-Gradient Methode 2 nur 30 min dauert, wurde diese jedoch hauptsächlich angewendet. Die Retentionszeiten lagen hierbei für apo- und holo-PCP bei 13,1 min bzw. 11,1 min (siehe Abb. 5.7).

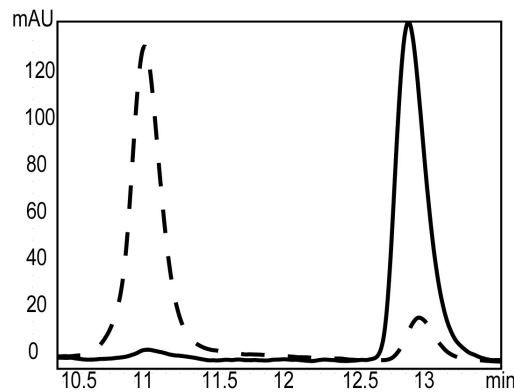


Abb. 5.7: Die HPLC-Trennung von apo- und holo-PCP nach Methode 2 mittels C18-Reverse-Phase Chromatographie. Die gestrichelte Linie präsentiert holo-PCP und die durchgezogene Linie apo-PCP.

Die Retentionszeiten für apo-ACP bei HPLC-Gradient Methode 3 betragen 18,65 min und für holo-ACP 18,0 min (siehe Kapitel 4.4.2.2).

Anschließend wurde die Möglichkeit zur Trennung der beiden Formen ausgenutzt, um über die Messung der prozentualen Modifikation von CP K_M und k_{cat} -Werte für die beiden Substrate CoA und CP für Sfp zu bestimmen.

5.1.3.2. Bestimmung der K_M - und k_{cat} -Werte von Sfp für PCP als Substrat

Nach Reinigung, Dialyse und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Sfp und PCP für biochemische Untersuchungen eingesetzt. Der angewendete Priming-Assay für die Aktivität der PPTase basiert auf dem Transfer des 4'-Phosphopantetheinyl-Rests von CoA auf das konservierte Serin des PCP.

Da sowohl CoA, als auch das CP Substrate von Sfp sind, wurden für die Bestimmung von kinetischen Daten jeweils das CoA oder das CP im Sättigungsbereich konstant gehalten, bzw. die Konzentration des CPs oder des CoAs variiert. Es kann also angenommen werden, dass die Katalyse nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung verläuft. Daher wurde für die biochemische Charakterisierung von Sfp mit CP das CoA bei 1 mM konstant gehalten und mit 10 nM Sfp, 10 mM $MgCl_2$ im Priming-Assay-Puffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Die CP-Konzentration wurde im Bereich von 1 bis 125 μM variiert. Die kinetischen Daten für CoA wurden bei folgenden Bedingungen bestimmt (100 μM CP, 10 nM Sfp, 10 mM $MgCl_2$ in Priming-Assay-Puffer und für 10 min bei 37°C inkubiert). Die CoA-Konzentration wurde im Bereich von 1 μM bis 1 mM variiert. Die Reaktion wurde mit Solvent B (ACN oder Methanol) abgestoppt und auf eine C_{18} -Säule aufgetragen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen apo- und holo-Form des CPs wurde mittels HPLC bestimmt. Dabei zeigte sich,

dass die CP in apo/holo-Mischungen vorlagen: PCP (2-4 %), ACP (14-18 %) und hPCP (14-20%) wurden bereits *in vivo* (während Expression) zur holo-Form modifiziert. Die prozentuale Modifikation *in vivo* ist von der Expressionstärke und Expressionszeit des CPs abhängig (Diese Daten sind unter Standardbedingung bestimmt worden, siehe 4.2.1.1). Mit dem erhaltenen Wert und der eingesetzten Menge CP im Reaktionsgemisch wurde dann auf die gebildete Produktmenge zurückgerechnet. Anschließend wurden die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 5.8).

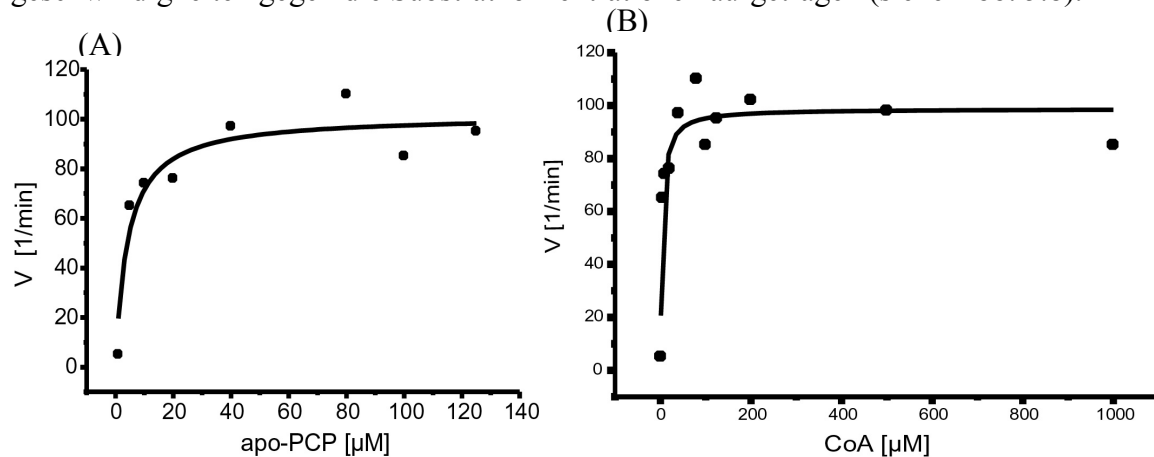


Abb. 5.8: Bestimmung der K_M - und k_{cat} -Werte von Sfp für PCP und CoA. Darstellung von Reaktionsgeschwindigkeit V als Funktion der Substratkonzentration bei (A) PCP und bei (B) CoA. Die Kurve wurde mit dem Programm Origin 5,0 gezeichnet, die Fehlerrate beträgt um $\pm 2,8\%$.

Die kinetische Daten für die posttranslationale Modifikation von PCP und CoA mit Sfp-H₆ ergaben folgenden K_M - und k_{cat} -Werte:

Tabelle 5.4: K_M - und k_{cat} -Werte von PCP und CoA durch PPTase Sfp-H₆

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
PCP (TycC3, <i>B. brevis</i>)	$4,5 \pm 1,0$	96 ± 4	21,6
CoA	$0,8 \pm 0,2$	99 ± 4	126,5

Diese Daten sind vergleichbar mit den von Quadri (Quadri *et al.*, 1998c) bestimmten Werten für das *wt*-Sfp aus *B. subtilis* mit apo-H₆SrfB1.

5.1.3.3. Bestimmung der Metallionen-Abhängigkeit des Priming-Assays

Die posttranslationale Modifikation der CP ist eine Mg^{2+} -Ion abhängige Reaktion. Das Metallion dient dabei als Kofaktor zur Ladungsstabilisierung bei der Bindung von CoA. In den folgenden Experimenten sollte ermittelt werden, welche Metallionen diese Funktion erfüllen können. Die kinetischen Daten dieser Kofaktoren sollten dann erfasst werden. Als

Negativkontrolle für die Konvertierung von apo- zu holo-CP wurden Reaktionsansätze ohne die PPTase, CoA oder der zweiwertige Metallionen verwendet (siehe 5.9).

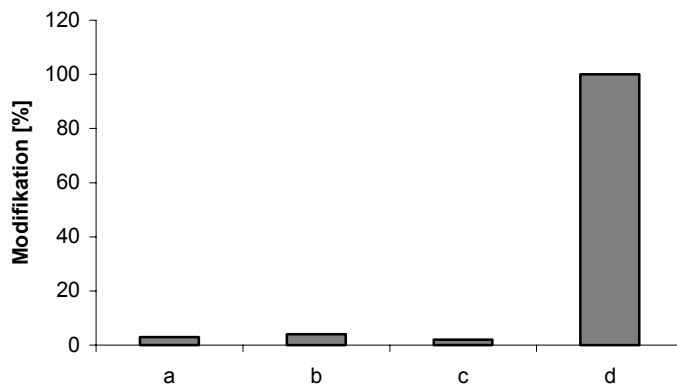


Abb. 5.9: Einfluss von Mg^{2+} auf die PPTase Aktivität. Es wurde 100 pmol PCP, 25 nM Sfp-H₆, 1 mM CoA und 10 mM $MgCl_2$ im Priming-Assay-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurden folgende Verbindungen in den jeweiligen Reaktionsgemisch weggelassen: (a) CoA, (b) Sfp-H₆, (c) Mg^{2+} . Bei (d) wurden alle Komponenten zu gegeben (Positivkontrolle).

In Abb. 5.9 ist deutlich zu sehen, dass ohne Metallion keine Reaktion stattfindet. Im Anschluss wurden andere zweiwertige Metallionen als Kofaktoren für Sfp verwendet. Es wurde $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$ und $ZnCl_2$ in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Die Daten sind im Abb. 5.10 dargestellt.

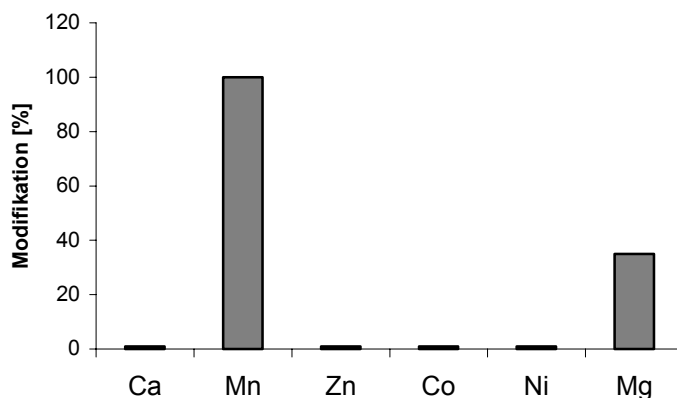


Abb. 5.10: Einfluss des Metallions bei der posttranslationalen Modifikation mit Sfp. 100 pmol PCP wurden mit 25 nM Sfp, 1 mM CoA, 75 mM MES, pH 6,0 30 min bei 37°C inkubiert. Die Konzentration der eingesetzten Metallionen betrug immer 10 mM.

Mit Mn^{2+} oder Mg^{2+} als Metallion kann die posttranslationale Modifikation stattfinden, mit Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} hingegen ist Sfp inaktiv. Diese Metallionen wurden ebenfalls für AcpS aus *B. subtilis* als Kofaktoren getestet, es konnte dort ebenfalls mit Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} keine Modifikation von ACP (FAS *B. subtilis*) festgestellt werden. Mit Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen wird apo-ACP jedoch zu holo-ACP modifiziert. Überraschend war hierbei, dass die Modifikation in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ion deutlich besser abläuft.

Die Metallionen wurden von 1 μ M bis 500 mM Endkonzentration eingesetzt. Es zeigte sich, dass PCP bei $NiCl_2$ -, $CoCl_2$ - und $ZnCl_2$ -Konzentrationen oberhalb von 20 mM ausfällt; bei niedrigeren Konzentrationen wurde keine Modifikation beobachtet.

Für Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen wurden kinetische Daten ermittelt, hierbei wurde die Konzentration des jeweiligen Metallions variiert, die Konzentration von PCP (100 μM), Sfp- H_6 (25 nM) und CoA (1 mM) konstant gehalten (siehe Abb. 5.11 und Tabelle 5.2).

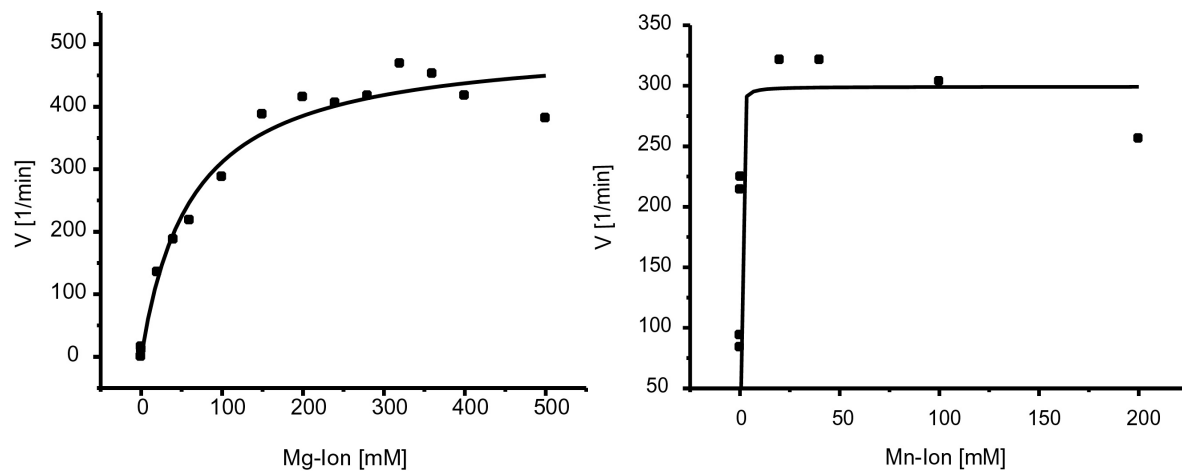


Abb. 5.11: K_M - und k_{cat} -Bestimmung von Sfp für Mg- und Mn-Ionen. Gemessen wurde im Bereich (a) MgCl_2 von 0-500 mM und (b) MnCl_2 von 1-200 μM .

Die K_M - und k_{cat} -Werte für Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen sind in Tabelle 5.2 dargestellt, wobei die katalytische Effizienz mit Mn^{2+} -Ionen ca. 300 mal höher als mit Mg^{2+} -Ionen ist.

Tabelle 5.2: K_M - und k_{cat} -Werte von Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen für Sfp- H_6

Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$]
Mg^{2+} -Ion	$62,5 \pm 1,6$	506 ± 22	8,09
Mn^{2+} -Ion	$0,092 \pm 0,007$	229 ± 28	2491,3

5.1.3.4. Bestimmung des pH-Optimums von Sfp- H_6

Zur Ermittlung einer eventuellen Veränderung des pH-Optimums von Sfp- H_6 im Vergleich zu *wt*-Sfp, wurde die Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes (pH von 5,0 bis 10) ermittelt. Diese Messungen wurden mit nicht-radioaktiv markiertem CoA durchgeführt. Dazu wurden die 25 nM Sfp- H_6 enthaltenden Reaktionsansätze für 10 min bei 37°C inkubiert (siehe 4.3.1) und anschließend mittels HPLC die Menge an gebildetem *holo*-PCP bestimmt (siehe 4.4.2.2). Es wurden die folgenden Puffer mit einer Endkonzentration von 75 mM verwendet: für pH 5,0-6,5 (MES/NaOH), pH 7,0-8,0 (HEPES/NaOH) und pH 8,5-10,5 (Tris/HCl). Für das *wt*-Sfp wurde zuvor ein pH-Optimum von 6,0 ermittelt (Quadri *et al.*, 1998c), der hier für das Sfp- H_6 bestätigt werden konnte (siehe Abb. 5.12).

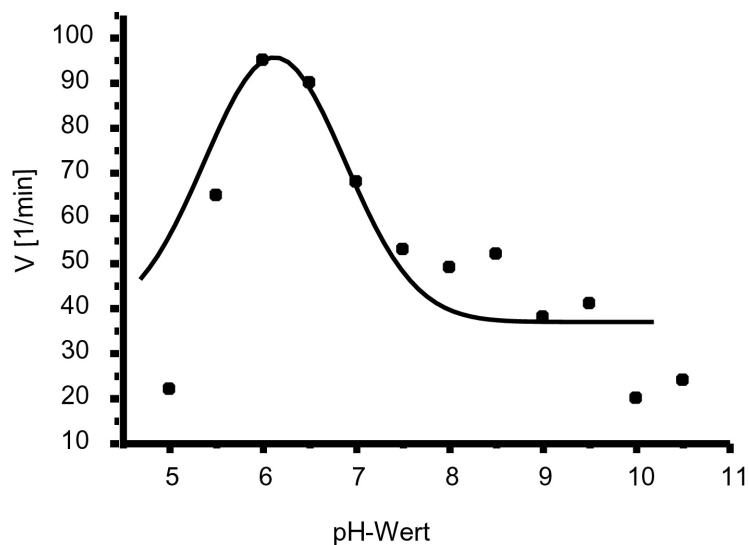


Abb. 5.12: Die pH-Wert Abhängigkeit von PPTase Reaktion mit Sfp-H₆. Hierbei wurde 100 pmol PCP, 25 nM Sfp-H₆, 10 mM MgCl₂ und 1mM CoA bei pH von 5,0-10,5 gemessen. Die Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Die Kurve wurde mit dem Programm Origin 5,0 gezeichnet, die Fehlerrate beträgt um ± 0,7 %.

5.1.4. Mutationsanalyse von Sfp

Die strukturellen Informationen, die aus der Kokristallstruktur von Sfp und CoA erhalten wurden, erlauben in die Zuordnung einiger Aminosäurereste zu bestimmten Funktionen im Reaktionsgeschehen. Es wurde versucht durch gezielte Mutagenese von Sfp diese Funktionen zu verifizieren und dabei Rückschlüsse auf die CP-Binderegion und den Reaktionsmechanismus der posttranslationalen Modifikation des CP zu ziehen. Bei der Wahl der Mutationen wurde darauf geachtet, dass diese keinen tiefgreifenden Einfluss (wie z.B. die sterische Hinderung mit benachbarten Aminosäuren) auf die Struktur des Sfp haben. Aus diesem Grund wurden die Mutanten zuerst mit dem Programm Swiss-PDB-Viewer v3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv>) (Guex and Peitsch, 1997) anhand der bekannten Sfp-Struktur modelliert, bevor sie dann experimentell erstellt wurden.

Die Einführung von Punktmutationen ist in Kapitel 4.1.2 beschreiben. Die Sequenz der verwendeten Primer ist im Anhang aufgeführt (siehe Anhang Tabelle 8.3). In dieser Arbeit wurden 19 Punktmutanten und drei Verkürzungsmutanten von Sfp konstruiert. Hierbei diente das pQE60-Sfp Plasmid als DNA-Templat. In Tabelle 5.3 sind die Punktmutanten von Sfp und Sfp-Verkürzungsmutanten mit den zugehörigen Primerpaaren (siehe Tabelle 5.6) aufgeführt. Die jeweilig resultierenden Plasmide wurde verifiziert durch DNA-Sequenzierung und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert. Nach erfolgter Testexpression wurde der jeweils beste Stamm zur Überproduktion von Sfp-Mutanten verwendet.

5.1.4.1. Expression von Sfp-Punktmutanten

Quadri und Mitarbeiter haben gezeigt, dass eine Punktmutation in Sfp häufig zur Unlöslichkeit des Proteins führt (Quadri *et al.*, 1998c). Aus diesem Grund sind bisher nur wenige biochemische Daten über Sfp-Mutanten bekannt. In dieser Arbeit führten die Punktmutationen in Sfp häufig ebenfalls zu schlechter Löslichkeit ($> 0,1$ mg/L Medium) bzw. zur Unlöslichkeit, was die Analyse dieser Mutanten erschwerte oder schlicht unmöglich machte. Um dieses Problem zu lösen wurde die Temperatur während der Expression auf 25-28 °C gesenkt und zur Induktion nur wenig IPTG (0.1 mM Endkonzentration) eingesetzt. Dadurch konnten die Sfp Punktmutanten Protein in löslicher Form erhalten werden.

Tabelle 5.3: Die Punktmutanten in Sfp und dazu verwendetes Primerpaar.

Mutation ³	Primerpaar	Mutation	Primerpaar
D40A	P1 und P2	K112A	P19 und P20
D40K	P3 und P4	E117A	P21 und P22
T44S	P5 und P6	K120A	P23 und P24
K75N	P7 und P8	E127A	P25 und P26
S89L	P9 und P10	K150A	P27 und P28
H90A	P9 und P11	E151S	P29 und P30
H90N	P9 und P12	E151Q	P31 und P32
D107N	P13 und P14	K155A	P33 und P34
D107E	P15 und P16	K155R	P35 und P36
E109D	P17 und P18		

In Abb 5.13 ist der Gesamtzellextrakt einiger Sfp-Mutanten auf dem SDS-Gel und zugehörigem Western-Blot dargestellt. Dabei wurde als erster Antikörper ein polyklonaler α -Sfp-Antikörper aus Kaninchen (1:5000) und Anti-Kaninchen Antikörper als Sekundärantikörper verwendet (Mofid, 1999b). Der α -Sfp-Antikörper kann spezifisch Sfp oder Sfp-Mutanten erkennen. In der Abb. 5.13 ist deutlich zu sehen, dass die Expression der Sfp-Mutanten in *E. coli* BL21 erfolgreich war.

³ Die Nummerierung des Sfps erfolgt nach dem Sfp-Gen aus *Bacillus subtilis*

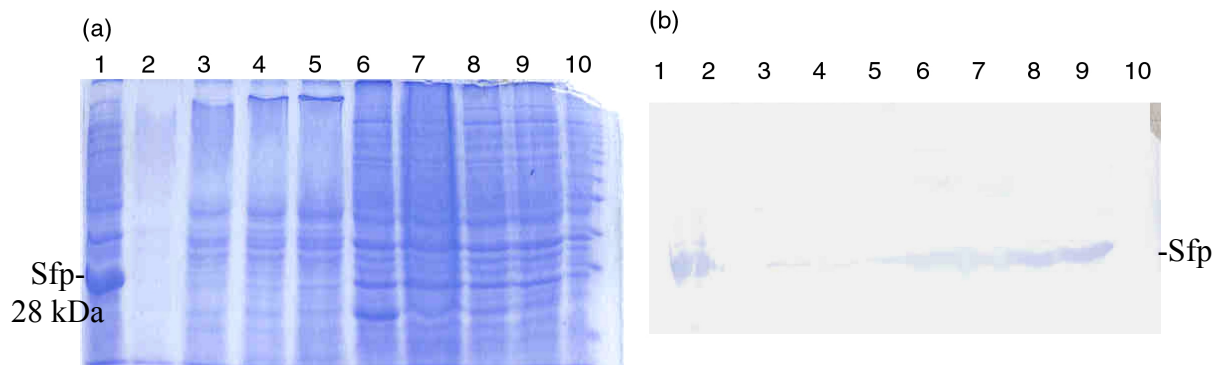


Abb. 5.13: Der Gesamtzellextrakt von acht Sfp-Mutanten (a) 12 %iges Laemmli SDS-Gel Coomassie gefärbt und (b) korrespondierender Western-Blot. (1) Sfp als Positivkontrolle, (2) E127A, (3) K150A, (4) E151S, (5) E109D, (6) T44S, (7) S89L, (8) K75N, (9) H90A und (10) Negativkontrolle *E. coli* BL21.

Nach Variation der Expressionsbedingungen wurden die Sfp-Mutanten D40A, D40K, T44S, E109D, K112A, E117A, K120A, E127A, K150A, K155A und K155R als lösliche Proteine mit durchschnittlich 1-2 mg/L Medium erhalten. Die Mutanten K75N, H90A, H90N, D107E, D107N und E151Q konnten mit 4-9 mg/L Medium erhalten werden. Die Sfp-Mutanten S89L und E151S wurden jedoch nur als schwer lösliches Protein produziert (siehe Abb. 5.14). Die beiden Mutanten wurden mittels Harnstoff denaturiert, über Ni-NTA Superflow (siehe 4.2.5) gereinigt und wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben zurückgefaltet. Nach Reinigung wurden 12 mg/L Medium S89L und 1-2 mg/L E151S-Mutante erhalten.

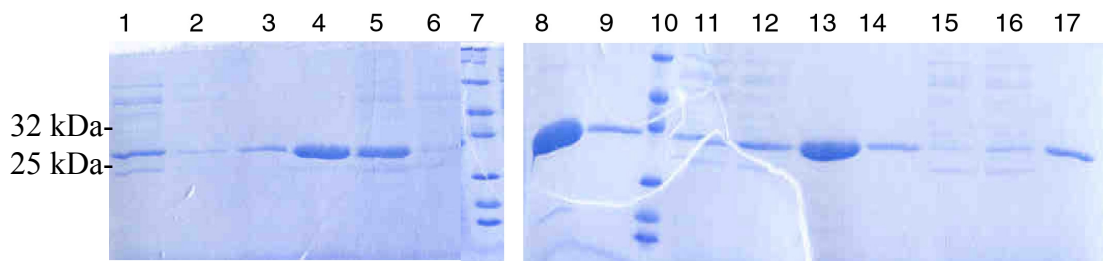


Abb. 5.14: 12 % iges Laemmli SDS-Gel verschiedener nach Ni-NTA gereinigter Sfp-Mutanten. Gezeigt sind Coomassie Blue gefärbte SDS-Gele (1) K120A, (2) E117A, (3) K112A, (4) H90A, (5) H90N, (6) E151S, (7) MW, (8) K75N, (9) K155R, (10) MW, (11) E151Q, (12) D107E, (13) S89L, (14) D107N, (15) T44S, (16) D40A, (17) D40K.

5.1.4.2. Biochemische Charakterisierung der Sfp-Punktmutanten

Nach Expression und Reinigung der Sfp-Punktmutanten erfolgte die Untersuchung ihrer enzymatischen Funktion. Der verwendete Enzymassay, der sog. „Priming-Assay“ (siehe Abb. 2.17a), wurde sowohl mit radioaktiven [^3H]-CoA, als auch mit nicht radioaktiven CoA durchgeführt (Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998b). In Abb. 5.15 ist die Aktivität dieser Mutanten mit radioaktiven [^3H]-CoA und verschiedenen CP graphisch dargestellt. Als CP wurde PCP (schwarz) und ACP (grau) verwendet. Dabei wurde 1 mM CoA, 10 μM CP,

25 nM Sfp-Punktmutante, 10 mM MgCl₂ in Priming-Assay-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert.

Elf von Neunzehn Sfp-Punktmutanten zeigten eine enzymatische Modifikation sowohl von PCP als auch von ACP mit dem Kosubstrat CoA. Der Einsatz verschiedener CP diente dabei zur Untersuchung der Substratspezifität der Sfp-Mutanten. Aus Abb. 5.15 geht hervor, dass außer bei D40A, D40K und S89L keine der Punktmutationen zu einer Änderung der aktiver Substratspezifität geführt hat.

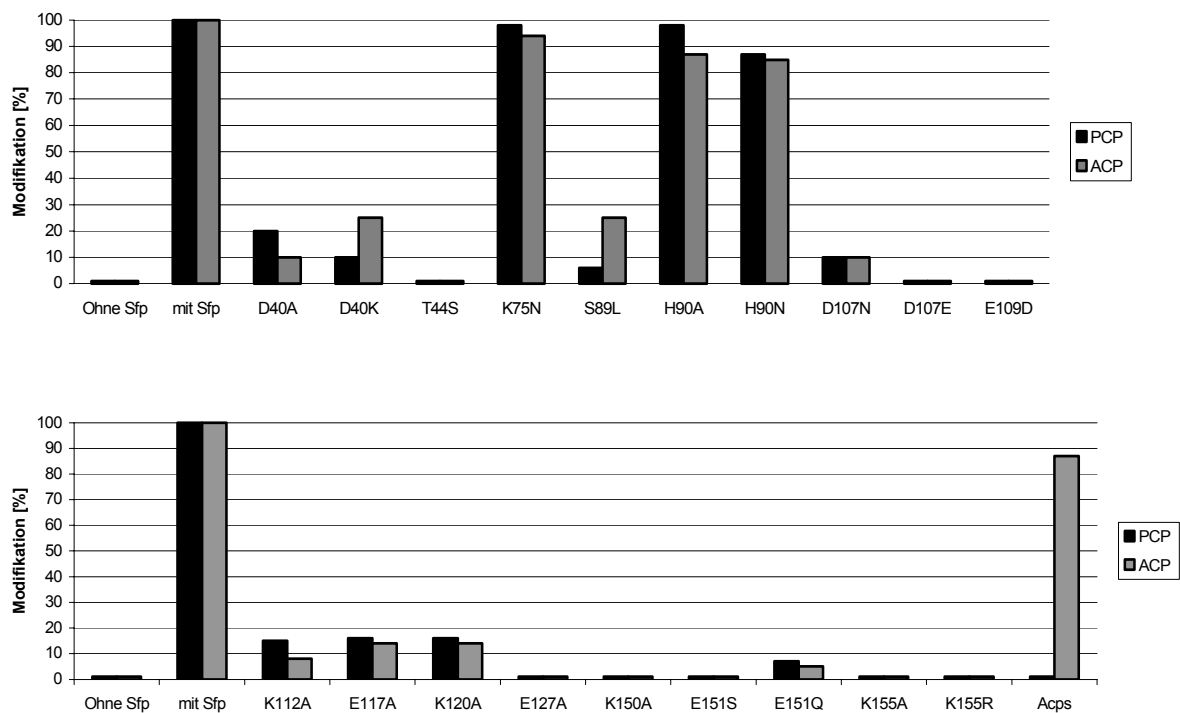


Abb. 5.15: Aktivitätstest von Neunzehn verschiedenen Sfp-Mutanten. Dargestellt ist die Modifikation von PCP (schwarz) und ACP (grau) mit dem Kosubstrat CoA zur Determinierung der Substratspezifität der Sfp-Mutanten.

Zur Bestimmung von K_M - und k_{cat} -Werten der Sfp-Mutanten wurde die in Kapitel 4.4.2.2 beschriebene HPLC-Methode verwendet. Dabei werden die Konzentrationen der beiden Substrate CoA und CP unabhängig voneinander unterhalb der Sättigungsgrenze variiert und dadurch K_M - und k_{cat} -Werte für beide Substraten bestimmt. Als CP wurde PCP verwendet, da es sich dabei um das natürliche Substrat von Sfp handelt. Da sich hPCP (die hPCP-Variante wird genau im Kapitel 5.2.1.2 beschrieben) im wesentlichen genauso wie ACP verhält, aber eine bessere katalytische Effizienz zeigt. Zur Bestimmung kinetischer Daten wurde die CP-Konzentration im Bereich von 1 bis 125 μ M variiert und mit 1 mM CoA, 10 nM Sfp-Mutanten und 10 mM MgCl₂ im Priming-Assay-Puffer 10 min bei 37 °C inkubiert.

Biochemische Daten für CoA wurden durch Variation der CoA-Konzentration im Bereich von 1 μM bis 1 mM erhalten. Dabei wurde die Konzentration von 100 μM CP, 10 nM Sfp, 10 mM MgCl_2 im Priming-Assay-Puffer konstant gehalten und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Die kinetischen Daten für die posttranslationale Modifikation von PCP und hPCP, als auch für CoA, mit den Sfp-Punktmutanten sind in Tabelle 5.4 aufgelistet.

Tabelle 5.4: Kinetische Daten der Sfp-Punktmutanten

Mutante	K_M [μM]			K_{cat} [min^{-1}]		
	PCP	hPCP	CoA	PCP	hPCP	CoA
Sfp	$4,5 \pm 1,0$	26 ± 6	$0,78 \pm 0,2$	$96 \pm 4,0$	$96 \pm 4,0$	$99 \pm 4,0$
D40A	26 ± 12	$21,2 \pm 7$	$0,9 \pm 0,2$	86 ± 5	87 ± 4	82 ± 8
D40K	95 ± 10	$19,8 \pm 5$	$1,3 \pm 0,1$	72 ± 4	91 ± 8	$75 \pm 3,0$
T44S	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
K75N	$5,8 \pm 3,4$	30 ± 2	$1,2 \pm 0,7$	114 ± 11	108 ± 8	94 ± 8
S89L	78 ± 11	32 ± 7	$5,5 \pm 1,3$	40 ± 10	85 ± 3	38 ± 9
H90A	$5,8 \pm 3,0$	24 ± 7	$2,1 \pm 0,3$	95 ± 9	$87,3 \pm 9$	88 ± 4
H90N	$5,2 \pm 2,4$	22 ± 9	$1,7 \pm 0,5$	99 ± 5	93 ± 5	89 ± 5
D107N	$11,2 \pm 1,3$	41 ± 3	$2,3 \pm 1,5$	0,5- 1,0	0,1- 0,3	0,5-1,0
D107E	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E109D	nd	nd	nd	nd	nd	nd
K112A	105 ± 13	510 ± 27	$3,3 \pm 1,5$	33 ± 14	75 ± 14	68 ± 11
E117A	68 ± 17	485 ± 38	$4,3 \pm 0,5$	39 ± 22	77 ± 18	82 ± 18
K120A	75 ± 8	480 ± 15	$2,3 \pm 0,7$	56 ± 8	$82 \pm 3,5$	77 ± 10
E127A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
K150A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E151S	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E151Q	$9,5 \pm 3,2$	37 ± 8	$1,8 \pm 0,7$	0,5-1,0	0,1-0,3	0,5-1,0
K155A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
K155R	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: nicht detektierbar

Um sicher zu gehen, dass die Rückfaltung der Sfp-Punktmutanten S89L und E151S keinen Einfluss auf die Aktivität hat und sich die Proteine dabei korrekt gefaltet haben, wurde Sfp ebenfalls denaturierend gereinigt und dessen Aktivität nach der Rückfaltung mittels HPLC

untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die denaturierende Reinigung und Rückfaltung von Sfp keinen Einfluss auf die K_m und k_{cat} -Werte hat.

In Tabelle 5.5 ist die katalytische Effizienz der Sfp-Punktmutanten dargestellt. Daraus geht hervor, dass die katalytische Effizienz mit PCP, hPCP und CoA bei den Punktmutanten D107N und E151Q drastisch gesunken ist, bei den Punktmutanten D40A, D40K, K112A, E117A und K120A sich jedoch nur die katalytische Effizienz mit CP stark geändert hat. Die Punktmutanten K75N, S89L, H90A und H90N zeigen ausschließlich eine Änderung der katalytischen Effizienz mit CoA. Die genaue Interpretation dieser Daten befindet sich in der Diskussion 6.1.4.

Tabelle 5.5: Katalytische Effizienz von Sfp-Punktmutanten.

Punktmutante	$k_{cat}/K_M [\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}]$		
	PCP	hPCP	CoA
Sfp	21,6	3,7	127
D40A	3,3	4,1	91,1
D40K	0,75	4,6	57,7
T44S	nd	nd	nd
K75N	19,6	3,6	78,3
S89L	0,51	2,6	6,9
H90A	16,4	3,6	42
H90N	19	3,7	52,4
D107N	0,04-0,08	<0,01	0,2-0,4
D107E	nd	nd	nd
E109D	nd	nd	nd
K112A	0,32	0,14	20,6
E117A	0,57	0,16	19
K120A	0,74	0,17	33,47
E127A	nd	nd	nd
K150A	nd	nd	nd
E151S	nd	nd	nd
E151Q	ca. 0,1	0,003-0,008	0,27-0,55
K155A	nd	nd	nd
K155R	nd	nd	nd

nd: nicht detektierbar

5.1.4.3. Bestimmung des pH-Optimums bei den Sfp-Mutanten H90A und H90N

Da sich das pH-Optimum der von Sfp katalysierten Reaktion bei 6,0 befindet (Quadri *et al.*, 1998c) wurde vermutet, dass das konservierte Histidin 90 einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion hat (pK_R der Seitengruppe von Histidin ist 6,04, siehe (Nelson and Cox, 2002)). Die Kristallstrukturanalyse der Sfp-CoA Kokristalle hat gezeigt, dass Histidin 90 bei der Bindung von CoA an Sfp beteiligt ist (Reuter *et al.*, 1999). Nun sollte anhand der Mutation Histidin 90 zu Alanin untersucht werden, ob eine Änderung des pH-Optimums beobachtet wird. Diese Messungen wurden nach dem im Kapitel 4.3.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurden 10 μ M PCP mit 25 nM Sfp H90A, 10mM $MgCl_2$ und 1 mM CoA in Priming-Assay-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert des Priming-Assays wurde von 5,0 bis 10,5 variiert. Dazu wurden die folgende Puffer mit 75 mM Endkonzentration im Priming-Assay verwendet: für pH 5,0-6,5 (MES/NaOH), pH 7,0-8,0 (HEPES/NaOH) und pH 8,5-10,5 (Tris/HCl). Die Detektion von gebildetem holo-PCP erfolgte über HPLC (siehe 4.4.42.2 und Abb. 5.16).

Für das *wt*-Sfp und Sfp-H₆ wurden ein pH-Optimum von 6,0 ermittelt (Quadri *et al.*, 1998c), aber für H90A wurde ein sehr breites Maximum im pH-Bereich zwischen 6,5 bis 10,0 bestimmt. In diesem Bereich konnte bei Sfp H90A eine PPTase Aktivität von 90% der Gesamtaktivität von Sfp bei pH 6,0 beobachtet werden.

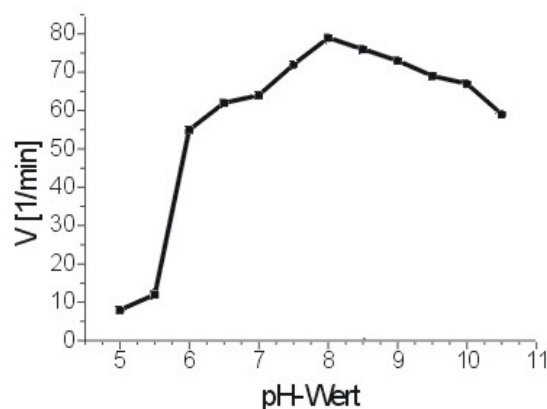


Abb. 5.16: Die pH-Wert Abhängigkeit der Reaktion der Sfp Mutante H90A. Hierbei wurde 10 μ M PCP, 25 nM Sfp (H90A), 10 mM $MgCl_2$ und 1mM CoA bei pH 5,0-10,5 gemessen. Die Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Die Kurve wurde mit dem Programm Origin 5,0 gezeichnet.

5.1.4.4. Verkürzungsmutanten von Sfp

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob zwei Sfp-Hälften sich in Lösung erkennen oder jede der Sfp-Hälften eventuell dimerisiert oder trimerisiert und dabei ein aktives Zentrum zu bildet. Um die Frage zu klären, ob sich Sfp mit seiner in zwei pseudodimeren Symmetrie Hälften teilen lässt und trotzdem eine katalytische Aktivität zeigt, wurden entsprechende Verkürzungsmutanten hergestellt. Außerdem sollte das verkürzte Sfp (165 Aminosäuren) aus *B. subtilis* JH642 *in vitro* auf seine Funktionsfähigkeit getestet werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden drei Verkürzungsmutanten von Sfp konstruiert. Die entsprechenden Bereiche wurden mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide (siehe Anhang Tabelle 8.3) mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau in den pQE60-Vektor kloniert. Die erhaltenen Expressionsvektoren pQE60-SfpH1, pQE60-SfpH2 und pQE60-Sfp165 wurden zuerst sequenziert und anschließend zur Expression in *E. coli* BL21 eingesetzt. Die Sfp-Verkürzungsmutanten sind in Tabelle 5.6 näher beschrieben. Die Verkürzungsmutante SfpH2 enthält ein zusätzliches N-terminales Methionin.

Tabelle 5.6: Daten der Verkürzungsmutanten des Sfp.

Name	Primer Paar	Länge (As)	Molekulargewicht (kDa)	pI-Wert
SfpH1 (1-103)	P37 und P38	103	12002	6,86
SfpH2 (104-210)	P39 und P40	106	12284	6,18
Sfp 165	P41 und P42	165	19264	6,70

Die Verkürzungsmutanten SfpH1, SfpH2 und Sfp165 sind nahezu vollständig löslich und konnten mittels Anionenaustauscher (Q-Sepharose), hydrophober Interaktions Chromatographie (Phenyl-Sepharose) und zuletzt Gelfiltration (Superdex 75) gereinigt werden (siehe Abb. 5.17). Bei der Konstruktion von SfpH1 und H2 wurde kein Histidin-Tag verwendet, um eine mögliche Störung bei der Dimerisierung zu verhindern.

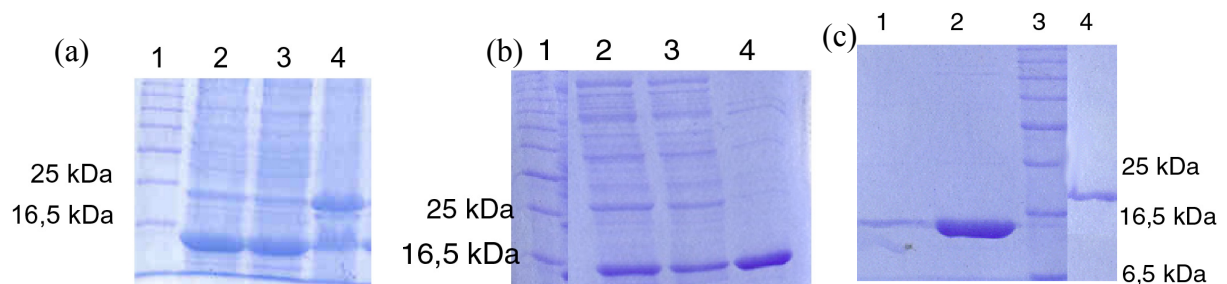


Abb. 5.17: SDS-Gel der Protein Reinigung der Sfp Verkürzungsmutanten. (a) Gesamtzellextrakt von (2) SfpH1 (1-103), (3) SfpH2 (104-210) und (4) Sfp 165. (b) Reinigung von SfpH1 über (2) Q-Sepharose, (3) anschließend über Phenyl-Sepharose und zuletzt über (4) Gelfiltration Superdex 75. (c) Gereinigte Sfp-Mutanten nach der Gelfiltration; (1) SfpH2, (2) SfpH1 und (4) Sfp165.

5.1.4.5. Charakterisierung der Sfp-Verkürzungsmutanten

Nach Reinigung der Sfp-Verkürzungsmutanten wurden diese bezüglich ihrer Aktivität und Spezifität untersucht. Dazu wurde ein qualitativer Test mit radioaktiven [^3H]-CoA (siehe Kapitel 4.3.1) verwendet. Abb. 5.18 zeigt eine graphische Darstellung der gemessenen Modifikation vom apo- zum holo-CP. Für die Messung der Aktivität und Substratspezifität wurden die Proteine PCP und ACP als Substrate verwendet.

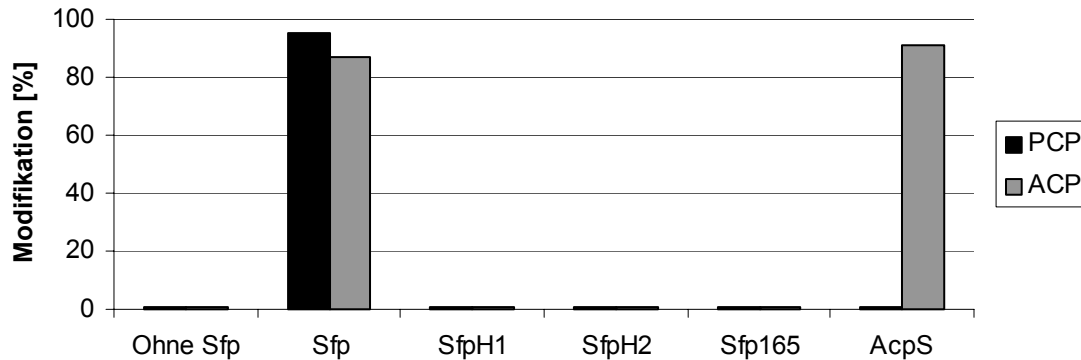


Abb. 5.18: Aktivitätstest von Sfp-Verkürzungsmutanten mit [^3H]-CoA. Es wurde sowohl PCP (schwarz) als auch ACP (grau) verwendet um die Aktivität von SfpH1 und SfpH2 Mutanten zu überprüfen.

Wie aus Abb. 5.18 ersichtlich, konnten für die Sfp-Verkürzungsmutanten keine PPTase Aktivitäten mit PCP und ACP festgestellt werden.

5.1.5. BIAcore Untersuchung von Sfp und Sfp H90A

Die BIAcore (*Biomolecular interaction analysis*) Untersuchungen wurden zu zwei Zwecken eingesetzt: Erstens sollte die Protein-Protein Interaktion zwischen Sfp und PCP untersucht und zweitens die Protein-Substrat Interaktion zwischen Sfp und CoA in Lösung analysiert werden. Dabei sollte die Frage behandelt werden, ob Mg^{2+} -Ionen bei der Bindung von PCP an Sfp notwendig sind. Außerdem sollte die Protein-Protein Interaktion zwischen der Sfp-Mutante H90A und PCP analysiert werden.

Die BIAcore Technologie nutzt die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen (Rich *et al.*, 2000). Der Sensorchip war mit einer Ni-NTA Dextranmatrix beschichtet. Dieser Chip besteht aus zwei Flusszellen, die getrennt oder parallel genutzt werden können. Alle Experimente wurden bei 25°C mit einer konstanten Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ in HBS-Puffer durchgeführt. Der Ni-NTA Chip wurde zuerst regeneriert. Anschließend wurde auf dem Chip nacheinander 100 μL NaOH-Lösung (10 mM), 100 μL EDTA-Lösung (500 mM), 100 μL NiCl_2 -Lösung (10 mM) sowie 60 μL

einer 15 μM PCP-Lösung aufgetragen. Der C-terminale His₆-Tag des PCP band an die Ni-NTA Dextranmatrix, was zu einem Antwortsignal von 1250 RU (*relative units*) im Sensogramm führte. In der Referenzflusszelle wurde kein NiCl₂ injiziert, so dass kein Protein an den Chip band und keine Erhöhung des Signals beobachtet werden konnte. Zur Analyse der kinetischen Daten wurde die BIAevaluation Software (BIAcore AB, Freiburg) verwendet. Die Daten wurden zuerst als Funktion des Massetransporteffekts angepasst, die Dissoziationsrate k_d wurde durch Anpassung der Steigung in der Dissoziationsphase in die Gleichung $R = R_0 e^{-k_d(t-t_0)}$, (R: Relative Sensogrammeinheit, t: Zeit) bestimmt. Die Assoziationsrate k_a wurde durch Anpassung der Steigung der Assoziationsphase in die Gleichung $k_a [B]/k_m \ll 1$, $k_m = 0,98 (D/h)^{2/3} (f/0,3 \cdot b \cdot l)^{1/3}$, (D: Diffusionskoeffizient, f: Flussrate, h,b,l: Dimensionen der Flusszelle) bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_D wird nach folgender Gleichung bestimmt: $K_D = k_d / k_a$.

5.1.5.1. Bestimmung von der Dissoziationskonstante K_D für PCP und Sfp mittels

BIAcore

Das größte Hindernis bei den BIAcore Experimenten war, dass beide Proteine einen C-terminalen His₆-Tag tragen und somit beide an das Chipmaterial binden könnten. Um dieses Problem zu lösen, wurde zuerst ein großer Überschuss an PCP (3000-fache Bindungskapazität des Chips von 50 ng/mm²) aufgetragen. Zusätzlich wurden kinetische Daten mit C-terminal His₆-getagten und *wt* Sfp aufgenommen, um auszuschließen, dass der His₆-Tag bei der Messung stört.

Zur Bestimmung der kinetischen Daten für die Protein-Protein Interaktion zwischen PCP und Sfp wurde die Konzentration von PCP (15 μM) konstant gehalten und die Konzentration von Sfp-H₆ und *wt*-Sfp von 150 nM bis 600 nM variiert. Sfp wurde immer drei Minuten nach Auftrag des PCPs auf dem Chip gegeben. Exemplarisch ist das Sensogramm für Sfp-H₆ auf immobilisiertem PCP im Abb. 5.19 dargestellt.

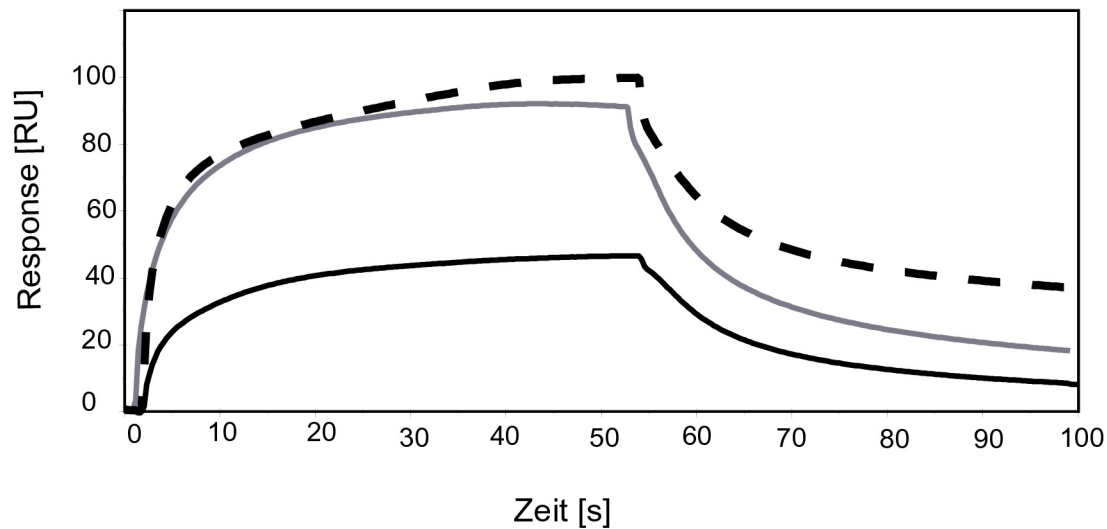


Abb. 5.19: BIAcore-Sensogramm von Sfp-H₆ auf PCP. Auf immobilisiertes PCP (15 μ M) wurden verschiedene Sfp-H₆-Konzentrationen injiziert. Schwarz (150 nM Sfp-H₆), grau (300 nM Sfp-H₆) und gestrichelte Line (600 nM Sfp-H₆).

Die K_D -Werte für die Protein-Protein Interaktion zwischen PCP und Sfp-H₆, *wt*-Sfp und der Sfp H90A Mutante sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Außerdem wurde der Einfluss von Mg^{2+} -Ionen auf diese Wechselwirkung untersucht. Dazu wurde wie oben beschrieben PCP an den Ni-NTA Chip gebunden; anschließend wurde Sfp 10 min bei 25°C mit 1 mM $MgCl_2$ inkubiert und dann auf den Chip aufgetragen. Dabei wurde die Konzentration von Sfp wie oben beschrieben variiert.

Tabelle 5.7: K_D -Werte der Protein-Protein Interaktion von PCP mit Sfp und Sfp H90A.

Substrat	K_D
300 nM Sfp-H ₆	62 nM
300 nM <i>wt</i> -Sfp	72 nM
300 nM SfpH ₆ + Mg-Ion	54.4 nM
300 nM <i>wt</i> -Sfp + Mg-Ion	56.9 nM
300 nM Sfp H90A	71 nM

Aus den Daten geht hervor, dass Sfp-H₆ sich wie *wt*-Sfp verhält (d.h. obwohl beide Proteine einen His₆-Tag besitzen konnte keine zusätzliche Bindung von Sfp-H₆ an den Ni-NTA Chip beobachtet werden). Bei der Bindung von Sfp an PCP spielen Mg^{2+} -Ionen keine Rolle; ebenso erkennt die Sfp H90A Mutante das PCP genauso gut wie *wt*-Sfp oder Sfp-H₆ (die Unterschiede der K_D -Werte liegen innerhalb der Fehlerrate).

Mittels BIAcore wurde versucht zusätzlich zur Protein-Protein Interaktion, die Interaktion von CoA mit Sfp-H₆ und dessen Mutanten zu untersuchen. Hierbei wurden zuerst 60 µL einer 300 nM Sfp-H₆ Lösung an Ni-NTA Dextran immobilisiert und dann 60 µL einer Mischung von 1 mM CoA und 1mM MgCl₂ auf das Sfp gegeben, dabei stellte sich heraus, dass CoA unspezifisch an das Chipmaterial bindet. Voraussichtlich durch direkte Wechselwirkung den Thiolgruppe von CoA mit dem immobilisierte Ni²⁺-Ion. Dieser Versuch wurde mit 1 mM CoA (ohne Sfp-H₆) wiederholt, dabei wurde die gleiche unspezifische Bindung an das Chipmaterial beobachtet. Auf Grund dieser unspezifischen Bindung konnten keine verwendbaren Daten über die Interaktion von Sfp mit CoA ermittelt werden. Es wurde deshalb auch auf eine Messung mit den Sfp-Mutanten verzichtet.

5.2. Gezielte Anpassung von PCPs an AcpS zur posttranslationalen Modifikation

Das ACP von FAS und PKS bildet Analog zu PCP von nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) ein als Thioester gebundenes Syntheseintermediat am proteingebundenen Kofaktor 4'-Phosphopantethein (4'-Ppant). Dieser Kofaktor ist somit für die Aktivität von NRPS, FAS und PKS notwendig. Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (4'-PPTase) übertragen das 4'-Ppant des CoA auf den invarianten Serinrest des ACP oder PCP (siehe Abb. 2.17a) (Marahiel *et al.*, 1997b).

Die *in vitro* Spezifitätsstudien an verschiedenen PPTasen von Lambalot und Mitarbeitern (Lambalot *et al.*, 1996) die Strukturdaten des AcpS-ACP-Komplexes (Parris *et al.*, 2000) sowie die NMR Strukturen von ACP (Xu *et al.*, 2001) und PCP (Weber *et al.*, 2000) waren die Ausgangspunkte für die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten. Das Ziel der folgenden Untersuchungen waren, PCP soweit zu modifizieren, so dass es auch von der auf ACP spezialisierten PPTase AcpS erkannt wird. Dadurch sollten die spezifitätsbestimmenden Reste des PCPs identifiziert werden. Außerdem sollten anhand von Verkürzungsmutanten die Domänengrenze des PCPs in NRPS-Modulen verifiziert werden.

5.2.1. Erkennung von NRPS durch AcpS

5.2.1.1. Strategie

Die AcpS-ACP Kokristallstruktur ergab detaillierte Einblicke in die Protein-Protein Interaktion zwischen AcpS und ACP. Aus den Strukturdaten war es möglich die meisten Aminosäuren von ACP, die für diese Interaktion verantwortlich sind, zu identifizieren. Der Großteil dieser Aminosäuren ist in Helix 2 von ACP (Nummerierung nach Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2001)) (siehe Abb. 5.20) lokalisiert. Trotz geringer Sequenzhomologie zwischen ACP und PCP auf Proteinebene (siehe Abb. 2.9 und Anhang Tabelle 8.7, die Sequenzidentität zwischen TycC3-PCP und ACP aus FAS *B.subtilis* beträgt 9 %) sollte versucht werden, ein neues hybrid-Peptidyl-Carrier Protein (hPCP) durch den Austausch von Helix 2 von PCP mit der korrespondierende Region von ACP zu konstruieren, das von dem AcpS aus *B. subtilis* als Substrat erkannt wird.

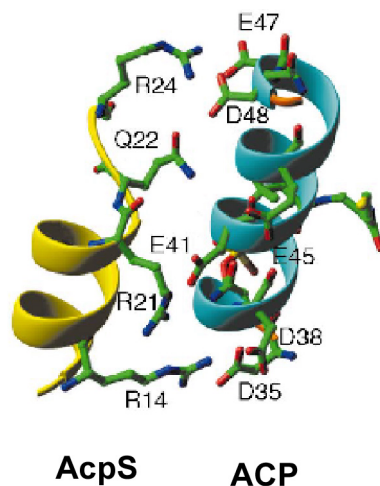


Abb. 5.20: Das Helix-Helix Interface zwischen AcpS und ACP. Die vier polaren (Q22) und basischen (R14, R21 und R24) Aminosäuren auf Helix 1 von AcpS (Gelb) bilden mit fünf sauren Aminosäuren (D35, D38, E41, E47 und D48) Wasserstoffbrücken (Nummerierung nach Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2001)).

5.2.1.2. Konstruktion von hPCP und hTycA

Das Ziel der zuvor angesprochenen Konstruktion des hPCP war die Erstellung eines universellen Peptidyl-Carrier-Proteins, das sowohl von AcpS und Sfp erkannt und posttranslational modifiziert wird. Die Konstruktion des hPCP geplant und durchgeführt von Robert Finking (Mofid *et al.*, 2002). Dazu wurde der für Helix 2 kodierende Bereich in pQE70-TycC3-PCP (Weber *et al.*, 2000) durch den korrespondierenden Bereich aus *acpA* (FAS von *B. subtilis*) ersetzt. Ein ähnlicher Austausch wurde anschließend auch in dem für PCP kodierenden Bereich von *pTycA* (Mootz *et al.*, 2000b) durchgeführt; das durch das Hybridprotein kodierte TycA wird im weiteren als hTycA bezeichnet. Das hTycA enthält neben der hPCP-Domäne noch eine A- sowie eine E-Domäne und erlaubt somit

weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Beladung des hPCPs mit Aminosäuren sowie deren Epimerisierung.

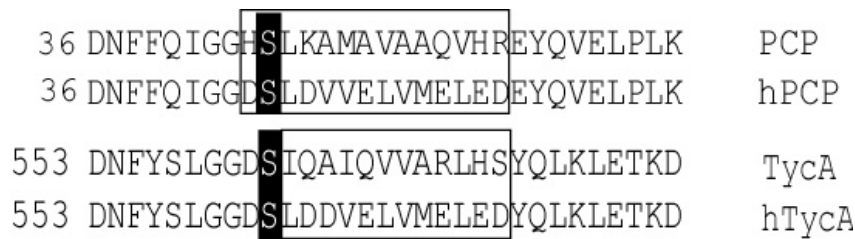


Abb. 5.21: Teilsequenzen von hPCP, hTycA und den entsprechender Eltern Protein. Die ausgetauschte Region ist mit einer weißen Box und das hoch konservierte Serin durch eine schwarze Box markiert.

Bei dem PCP wurden 14 Aminosäuren (von Robert Finking konstruiert) und bei hTycA 12 Aminosäuren in Helix 2 des PCP mit der korrespondierenden Region von ACP aus *B. subtilis* ausgetauscht. Zur Herstellung von *htycA* wurde das Primerpaar P54 und P55 verwendet (siehe Anhang Tabelle 8.3). In der Abb. 5.21 ist die Teilsequenz von hPCP, hTycA und deren Ausgangsproteinen dargestellt.

Die Expression der Hybrid-Proteine erfolgte in *E. coli* M15, die Reinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltration. Die wichtigsten Daten zu PCP, hPCP, TycA und hTycA sind Tabelle 5.8 zu entnehmen.

Tabelle 5.8: Daten zu den NRPS und hybrid-NRPS

Name	Herkunft	Länge (As)	Molekulargewicht (Da)
hPCP	TycC3PCP	90	10059
PCP	TycC3PCP	90	9972
hTycA	TycA	1087	122657
TycA	TycA	1087	122572

Die SDS-Gel Analyse (siehe Abb. 5.22) der gereinigten Proteine zeigt nur eine Bande für PCP, TycA und hTycA, jedoch zwei Banden bei hPCP und ACP (siehe Abb. 5.21), die vermutlich die apo- und holo-Form darstellen. Dieses Bild wurde schon zuvor für ACPs aus *E. coli* und *B. subtilis* beschrieben (Mootz *et al.*, 2001). Pro Liter Zellkultur konnte 20 mg hPCP (mit >95% Reinheit), 22 mg PCP (mit >95% Reinheit), 15 mg TycA (mit >90% Reinheit) und 15 mg hTycA (mit >95% Reinheit) erhalten werden. Die Reinheit wurde mittels HPLC bestimmt.

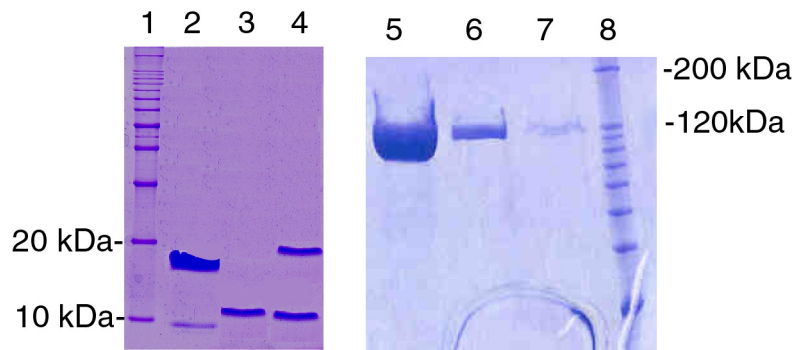


Abb. 5.22: SDS-Gel von ACP, hPCP, PCP, TycA und hTycA nach dem Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration. (1) Proteinmarker 10 kDa-Leiter, (2) ACP (*B. subtilis*) (3) PCP (*B. brevis*), (4) hPCP, (5) TycA (*B. brevis*), (6) hTycA (expremiert in *E. coli* M15) und (7) hTycA (expremiert in *E. coli* BL21).

5.2.1.3. Biochemische Charakterisierung von hPCP

Die *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von Mootz und Mitarbeitern haben gezeigt, dass AcpS von *B. subtilis* im Vergleich zu Sfp eine höhere Substratspezifität besitzt (Mootz *et al.*, 2001). AcpS aus *B. subtilis* kann das ACP der FAS und das D-Alanyl-Carrier-Protein (DCP) in das aktive holo-CP umwandeln. PCPs werden hingegen nicht als Substrat akzeptiert. Zunächst wurde ein qualitativer Test mit radioaktiven [^3H]-CoA (siehe Kapitel 4.3.1) durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 1 μM CP mit 200 nM [^3H]-CoA, 20 μM CoA, 10 mM MgCl_2 und 5,6 nM AcpS oder 25 nM Sfp im Priming-Assay Puffer (im Falle von AcpS wurde 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 verwendet) für 30 min bei 37°C inkubiert. In Abb. 5.23 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

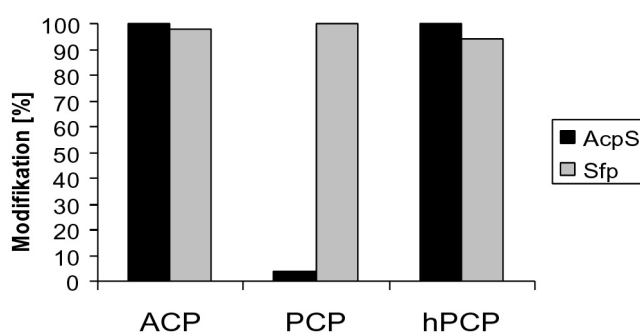


Abb. 5.23: Die posttranslationale Modifikation von apo-ACP, apo-PCP und apo-hPCP durch AcpS bzw. Sfp.

Aus Abb. 5.23 geht hervor, dass ACP und hPCP sowohl von Sfp als auch von AcpS erkannt und modifiziert wurden. Im Gegensatz dazu kann PCP lediglich von Sfp modifiziert werden. Die biochemische Charakterisierung erfolgte mittels HPLC. Hierbei stellte sich heraus, dass das Verhältnis der holo- zur apo- Form des gereinigten rekombinanten hPCP 49% zu 51% beträgt, was auf die Modifikation durch eine *E. coli* PPTase während der heterologen

Produktion zurückzuführen ist. Für PCP war zuvor gezeigt worden, dass ein apo- zu holo Verhältnis von 93% zu 7% nicht überschritten wird (Stachelhaus *et al.*, 1996).

Die hPCP Konzentration wurde im Bereich von 5 bis 180 μM variiert und dabei die Konzentration von 1 mM CoA, 10 nM Sfp, 12,5 mM MgCl_2 im Priming-Assay-Puffer konstant gehalten und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Tabelle 5.9: Kinetische Konstanten von Sfp und AcpS mit PCP und hPCP als Substrat.

Substrate	K_M [μM]		k_{cat} [min^{-1}]		k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]	
	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp
apo-PCP (2-140 μM)	n.b. ^a	4.5 ± 1	n.b.	96 ± 4	n.b.	21.6
apo-hPCP (2-180 μM)	$21.6 \pm 3^{**}$	26 ± 6	$14.3 \pm 0.5^{**}$	96 ± 4	0.7^{**}	3.7
apo-ACP* (2-8 μM)	0.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	22 ± 2	1.7 ± 0.1	129	1.2
apo-ACP* (20-200 μM)	68 ± 11	38 ± 8	125 ± 9	12.5 ± 1	1.8	0.3

^an.b., nicht bestimmt

* (Mootz *et al.*, 2001), ** wurde von Robert Finking durchgeführt (Mofid *et al.*, 2002)

Für ACPs aus *B. subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* wurden zwei kinetische Konstanten für niedrige und höhere ACP Konzentration beobachtet (siehe Tabelle 5.9) (McAllister *et al.*, 2000; Mootz *et al.*, 2001). Dies beruht vermutlich auf einer Konformationsänderung von ACP bei niedrigen und höheren Konzentrationen.

5.2.1.4. Biochemische Charakterisierung von hTycA

Die biochemische Charakterisierung von hTycA unterteilt sich in die Untersuchungen zur Protein-Protein Wechselwirkung zwischen hTycA und internen Domänen (Kommunikation zwischen der hPCP-Domäne mit A- und E-Domäne) sowie hTycA mit seinen Partnern, also für die posttranslationale Modifikation mit einer PPTase bzw. der Bildung des Produkts D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) mit ProCAT(TycB1).

5.2.1.4.1. Posttranslationale Modifikation von hTycA mit AcpS und Sfp

Nach der erfolgreichen Expression, Reinigung und Dialyse, wurden je 1 μM hTycA und TycA getrennt mit 25 nM Sfp oder 25 nM AcpS in Priming-Assay Puffer mit 200 nM [^3H]-CoA, 20 μM CoA und 10 mM MgCl_2 für 30 min bei 37°C inkubiert. Die quantitative Auswertung ist in Tabelle 5.10 zusammengestellt. Diese Untersuchung machte deutlich, dass sowohl AcpS wie Sfp die hPCP-Domäne innerhalb von hTycA erkennen und modifizieren, TycA hingegen nur von Sfp erkannt wurde

Tabelle 5.10: Phosphopantetheinylierung von TycA und hTycA durch AcpS und Sfp von *B. subtilis* in vitro mit [^3H]-CoA.

	ohne PPTase [%]	AcpS [%]	Sfp [%]
TycA	0	0	100*
hTycA	0	25	25

*100% = 25,135 DPM

5.2.1.4.2. Kommunikation der hPCP-Domäne mit der A-Domäne in hTycA

Die Untersuchung der Kommunikation der hPCP-Domäne mit Ihrer kognaten A-Domäne erfolgte durch einen Aminoacylierungsassay. Dabei wird das 4'-Ppant des PCPs durch die A-Domäne mit [^{14}C]-L-Phe beladen. Dazu wurden 1 μM hTycA oder TycA mit 2 μM [^{14}C]-L-Phe, 20 μM CoA, 25 nM rekombinante *B. subtilis* Ppant Transferase AcpS oder Sfp für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Präinkubation bei 37°C wurde zu der Mischung 5 mM ATP gegeben. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb 5.24. dargestellt.

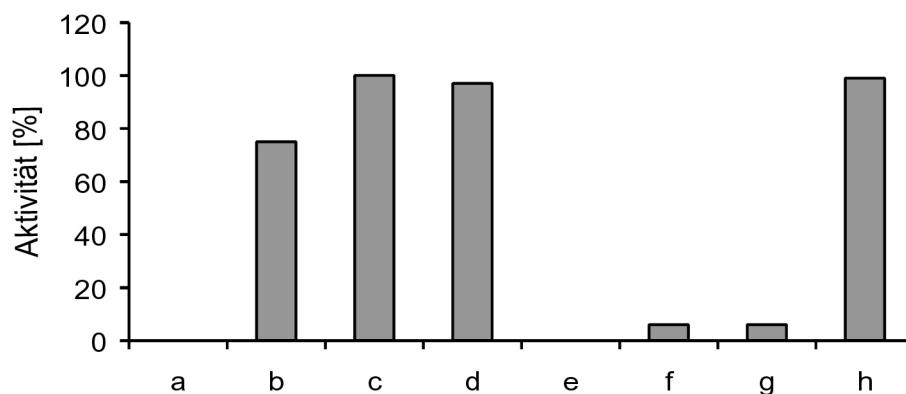


Abb. 5.24: Graphische Darstellung der posttranslationalen Modifikation von hTycA und TycA mit AcpS bzw. Sfp und die anschließende Aminoacylierung mit [^{14}C]-L-Phe. (a) hTycA ohne PPTase und ATP (b) hTycA ohne PPTase aber mit ATP, (c) hTycA mit AcpS und ATP, (d) hTycA mit Sfp und ATP, (e) TycA ohne PPTase und ATP (f) TycA ohne PPTase aber mit ATP, (g) TycA mit AcpS und ATP und (h) TycA mit Sfp und ATP.

Aus dem Versuch geht hervor (siehe Abb. 5.24), dass 75 % von hTycA bereits *in vivo* während der Expression in *E. coli* modifiziert wurden, wahrscheinlich durch die *E. coli* eigene AcpS. Die Präinkubation von hTycA mit AcpS konnte somit nur eine Steigerung von 25 % im Umsatz erreichen. Das Kontrollexperiment zeigte, dass TycA nach der heterologen Expression nur zu 5% in der holo-Form vorlag, vergleichbar mit anderen NRPS Modulen, die in *E. coli* überproduziert wurden. Die zusätzliche Inkubation von hTycA und TycA *in vitro* mit den PPTasen zeigte jedoch auch, dass hTycA sowohl mit AcpS als auch mit Sfp, TycA wie erwartet nur mit Sfp vollständig zur holo-Form überführt werden konnten. Diese Daten sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

Tabelle 5.11: Aminoacylierung von TycA und hTycA mit [14 C]-Phenylalanin.

	-PPTase [%]		AcpS [%]		Sfp [%]	
	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
TycA	0	5	0	5	0	100
hTycA	0	75	0	100*	0	100

*100% = 1 μ M [14 C]-Phe kovalent an holo-Protein gebunden

Zur zeitabhängigen Messung der Aminoacylierung von hTycA und TycA wurde, nach Präinkubation bei 37°C, zu der oben beschriebenen Reaktionsmischung 5 mM ATP gegeben. Die Proben wurden für 30 bis 850 s bei 37°C inkubiert (siehe Abb. 5.25).

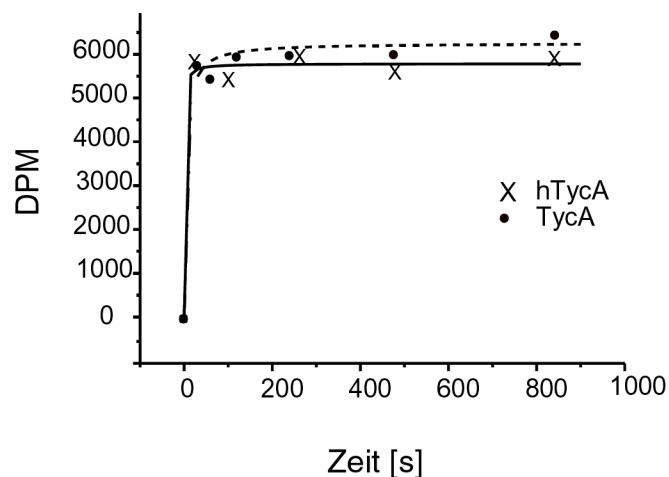


Abb. 5.25: Zeitabhängigkeit der kovalenten Inkorporation von [14 C]-L-Phe in TycA und hTycA.

Die zeitabhängige Aminoacylierung von TycA und hTycA wurde mit [^{14}C]-D- und [^{14}C]-L-Phe ausgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Bildung von Phe-S-Ppant-Enzym bei hTycA und TycA schon zum ersten Messpunkt (30 s) zu 100 % abgeschlossen war. Für eine Messung unterhalb dieses Zeitfensters ist die Verwendung der sogenannten *rapid quench reaction kinetics* erforderlich (Luo and Walsh, 2001). Aus technischen Gründen ist eine derartige Messung in unseren Laboren jedoch nicht möglich gewesen. Neuere Untersuchungen von Lusong und Mitarbeitern haben gezeigt, dass GrsA (das Initiationsmodul der Gramicidin-Synthetase S aus *B. brevis*) in weniger als einer Sekunde Phenylalanin auf den 4'-Ppant-Arm des Enzyms laden kann (Luo and Walsh, 2001). GrsA besteht ebenso wie TycA aus einer Phenylalanin-aktivierenden A-Domäne, PCP- und E-Domäne.

5.2.1.4.3. Kommunikation zwischen hPCP-Domäne mit E-Domäne in hTycA

Die Epimerisierungs- (E)-Domäne in TycA katalysiert die L- nach D-Phe Umwandlung des Aminoacyl-S-Ppant Substrats. Nach einer bestimmten Zeit bildet sich ein enzymabhängiges Gleichgewicht zwischen der D- und L-Konfiguration aus. GrsA z. B. benötigt für die Einstellung des Gleichgewichtes 1 Sekunde. Das natürliche Substrat der E-Domäne von TycA ist der Phe-S-Ppant der benachbarten PCP Domäne. In der folgenden Studie sollte anhand der Epimerisierungsrate von [^{14}C]- D-Phe zu [^{14}C]- L-Phe in hTycA, die Kommunikation von hPCP- mit der E-Domäne untersucht werden. Zu 1 μM holo-hTycA wurde 8,9 μM [^{14}C]- L-Phe (450 mCi/mmol) oder 71,4 μM [^{14}C]- D-Phe (56 mCi/mmol) in Assay-Puffer gegeben. Nach 15 min Präinkubation bei 37°C wurde zu der Mischung 2 mM ATP gegeben. Proben wurden in dem Zeitraum zwischen 30 s bis 30 min genommen und die Reaktion mit TCA gestoppt. Für die Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit TycA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.26 gezeigt.

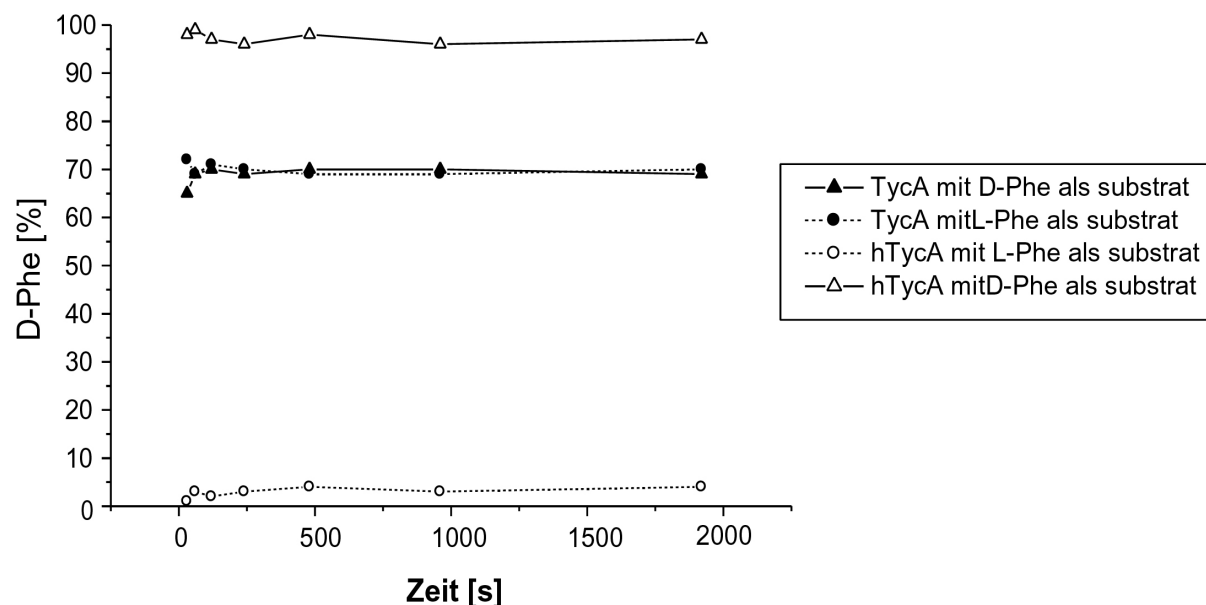


Abb. 5.26: Epimerisierungskinetiken von TycA und hTycA. L- zu D-Phe und D- zu L-Phe Epimerisierung in den Phe-S-Ppant-Enzym von hTycA und TycA. Offene Symbole repräsentieren hTycA und geschlossene TycA. Bei Dreiecken wurde holo-Enzym mit [^{14}C]- D-Phe bei 37°C inkubiert und bei Kreisen holo-Protein mit [^{14}C]- L-Phe. Nachdem die Reaktion mit 10% TCA gestoppt wurde, wurden die Aminosäuren von dem 4'-Ppant-Arm durch KOH abgespalten, durch organische Extraktion das vorher auf Ppant gebundene Phenylalanin von restlichem Protein getrennt und anschließend auf chiralen DC-Platten aufgetragen. Die DC-Platten wurden mit ACN/Wasser/Methanol [4:1:1(v/v/v)] als Solvent entwickelt und die Verteilung des radioaktiven Phe mittels eines zweidimensionalen Radioscanner (Rita) quantifiziert. Die prozentuale Fläche von D-Phe zu gesamt detektiertem Phe (D+L) wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Mit [^{14}C]- D-Phe als Substrat stellte sich schon nach 30 s (erster Messpunkt) bei hTycA ein Verhältnis von 95% D-Phe zu L-Phe ein und änderte sich in der Folge (bis 30 min) nicht. Mit [^{14}C]- L-Phe wurde ein Gleichgewicht von 5% D-Phe gemessen, daraus erfolgt, dass eine Epimerisierungsreaktion nicht statt gefunden hat. Nach Sequenzierung des gesamten hTycA konnte keine Mutation in der E-Domäne oder anderer Bereiche festgestellt werden. Daraus folgt, dass die Kommunikation zwischen hPCP und E-Domäne innerhalb von hTycA gestört ist. Das Kontrollexperiment mit TycA zeigt ein Gleichgewicht von D- zur L Form von 70% D-Phe.

5.2.1.4.4. Protein-Protein Interaktion von hTycA mit TycB1(ProCAT)

Das in dieser Arbeit konstruierte hTycA als Prototyp von hybriden PCP/ACP NRPS sollte anschließend auf die Protein-Protein Interaktion mit dem nativen Partner, TycB1 (ProCAT) getestet werden (siehe Abb. 5.27).

Als Modellsystem für die Kommunikation von hTycA mit andere NRPS Modulen eignet sich das bereits bestehende System von TycA mit ProCAT (TycB1) (Mootz *et al.*, 2000a; Stachelhaus *et al.*, 1998). ProCAT besteht aus einer C-Domäne, einer Prolin-aktivierenden A-

Domäne und einer PCP-Domäne. Inkubiert man die beiden rekombinanten Proteine TycA und ProCAT *in vitro* mit ihren Substraten Phenylalanin und Prolin in Gegenwart von ATP, so werden zunächst die 4'-Pant-Arme der Enzyme mit ihren Substrat-Aminosäuren beladen. Anschließend kommt es zur Bildung einer Peptidbindung, was in einem an ProCAT gebundenem Dipeptid DPhe-L-Pro resultiert (Abb. 5.29). Dieses Dipeptid kann nun in einer nichtenzymatischen Reaktion von ProCAT in Form des zyklischen DKP (D-Phe-L-Pro-Diketopiperazins) abgespalten werden. Der Grund für diese unkatalysierte Abspaltungsreaktion liegt in der *cis*-Konformation der Peptidbindung, die von der N-alkylierten Aminosäure, Prolin, induziert wird (Schwarzer *et al.*, 2001; Stachelhaus *et al.*, 1998). Dies führt zu einer räumlichen Annäherung der Amino-Funktion des Phenylalanins zu der als Thioester gebundenen Carboxy-Gruppe des Prolins. Die führt zu einem nukleophilen Angriff der Aminogruppe auf den Thioester und dadurch zur Abspaltung als DKP.

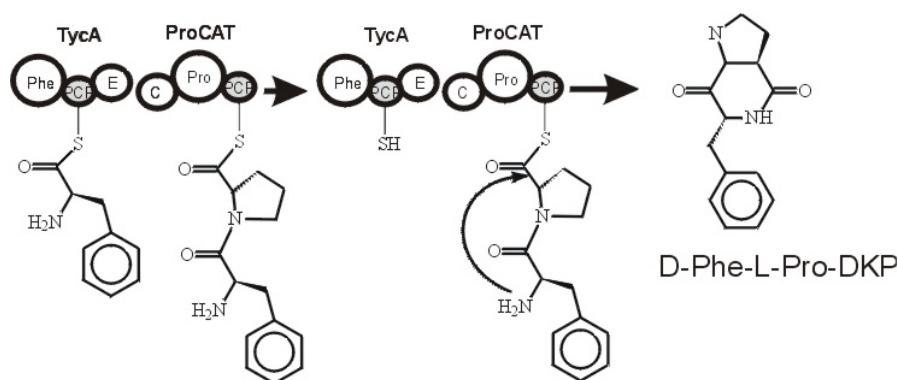


Abb. 5.27: Schematische Darstellung der DKP-Produktion mit TycA und ProCAT. Nach dem Peptidverknüpfung zwischen D-Phe und L-Pro kommt es zu einer nicht-enzymkatalysierten Abspaltung in Form des zyklischen D-Phe-L-Pro-DKP (Mootz *et al.*, 2000a; Stachelhaus *et al.*, 1998).

Das gebildete Produkt D-Phe-L-Pro-DKP wurde mittels HPLC nachgewiesen und quantifiziert (siehe 4.4.2.1). Für die quantitativen Versuche wurde hTycA, TycA (als Positivkontrolle), TycAS562A (als Negativkontrolle) und die E-Domänen-Deletionsmutante TycA(AT) mit ProCAT(TycB1) verwendet. Die holo-Enzyme wurden getrennt mit D-Phe oder L-Phe, L-Pro und ATP in Kondensierungspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in der Abb. 5.28 abgebildet und die qualitative Ergebnisse für TycA und hTycA mit ProCAT sind in Tabelle 5.12 wiedergegeben.

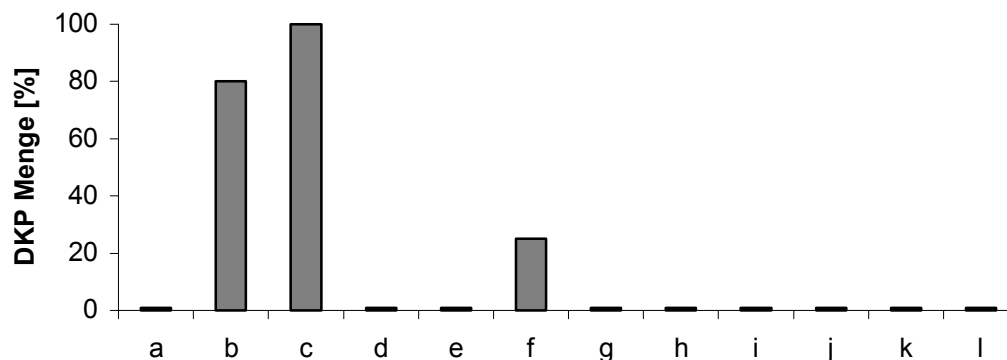


Abb. 5.28: DKP-Produktion von TycA und deren Mutanten. (a) TycA ohne Phe, (b) TycA mit L-Phe, (c) TycA mit D-Phe, (d) hTycA ohne Phe, (e) hTycA mit L-Phe, (f) hTycA mit D-Phe, (g) TycA (AT) ohne Phe, (h) TycA(AT) mit L-Phe, (i) TycA(AT) mit D-Phe, (j) TycA(S562A) ohne Phe, (k) TycA mit L-Phe(S562A), (l) TycA mit D-Phe(S562A). Hierbei wurde die [%] DKP-Menge auf die gesamte DKP-Menge von TycA mit D-Phe bezogen.

Nur in Anwesenheit von D-Phe als Substrat konnte hTycA mit ProCAT das DKP Produkt bilden (mit einer katalytischen Effizienz von 25 % im Vergleich zu TycA mit D-Phe als Substrat). Mit L-Phe konnte hTycA mit ProCAT kein D-Phe-L-Pro-DKP bilden. Die früheren Arbeiten von Stachelhaus und Mitarbeiter zeigten eine Stereospezifität der C-Domäne bezüglich ihres Substrates D-Phe (Belshaw *et al.*, 1999; Stachelhaus *et al.*, 1998). Daher ist bei einer gestörten Epimerisierungsaktivität in hTycA auch kein Produkt mit L-Phe zu erwarten. Mit TycA(S562A) konnte kein D-Phe-L-Pro-DKP Produkt detektiert werden. Dies steht im Einklang mit den von Stachelhaus und Mitarbeitern veröffentlichten Ergebnissen für TycA (A-PCPΔE) (Stachelhaus *et al.*, 1998).

Tabelle 5.12: DKP-Produktionsrate von hTycA und TycA mit TycB1.

	k_{obs} in min^{-1} mit L-Phe	k_{obs} in min^{-1} mit D-Phe
TycA	$45,2 \pm 1.1$	$56,3 \pm 1.3$
hTycA	n.b.	$14,1 \pm 0.7$

n.b. nicht bestimmt

5.2.1.4.5. Sekundärstruktur Analyse von hPCP, PCP und ACP

Die CD-Spektroskopie wurde zur Untersuchung der Sekundärstruktur der verwendeten CP verwendet. Das CD-Spektrum von 10 μM CP wurde in 10 mM Natrium-Phosphat Puffer bei einem pH von 7,0 aufgenommen. Die erhaltene Spektren wurden mittels des Computer Programms *Protein secondary structure* ausgewertet (Yang, 1986). Die Ergebnisse sind in Abb. 5.29 und Tabelle 5.13 dargestellt.

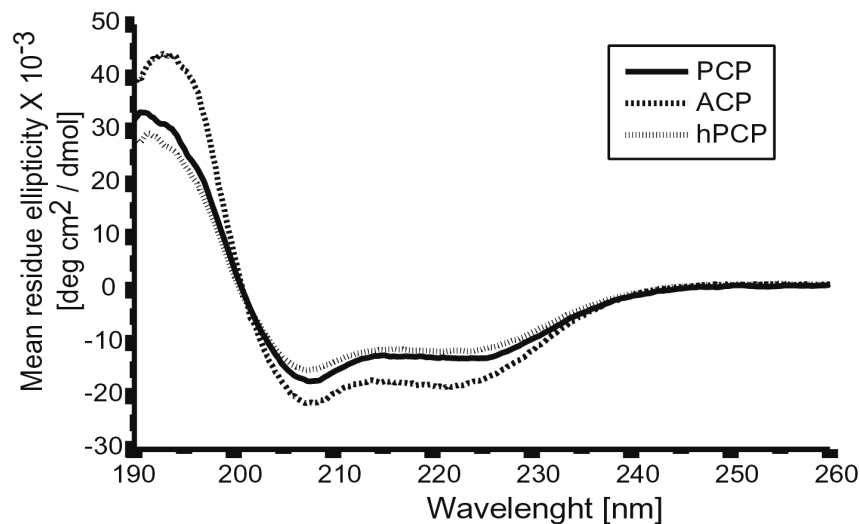


Abb. 5.29: CD-Spektrum von PCP, hPCP und ACP. Die CD Spektren von PCP (durchgezogene Linie) aus *B. brevis*, hPCP (punktierter Linie) und ACP (gestrichelte Linie mit Punkten) aus *B. subtilis* sind graphisch dargestellt.

Der Versuch wurde noch einmal mit Mg^{2+} -Ionen wiederholt, um den Einfluss von Mg^{2+} -Ionen auf die Sekundärstruktur von CP zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 10 μM CP mit 10 mM $MgCl_2$ bei 25°C für 30 min inkubiert und anschließend gemessen. Dabei konnte keine Änderung in der Sekundärstruktur der CP festgestellt werden (siehe Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13: Der gemessene Helix-Anteil der CP mittels CD.

Protein	PCP	hPCP	ACP
Helix [%]	46-48	45-48	45-50

5.2.1.5. Erkennung von NRPS (ProCAT) durch AcpS

Die Ergebnisse des Helixaustauschs in hPCP (14 Aminosäuren) und in hTycA (12 Aminosäure) zeigen, dass die neu konstruierten hybrid PCP/ACP NRPS *in vivo* und *in vitro* sowohl von Sfp als auch von AcpS erkannt werden konnten. Die Daten aus dem AcpS-ACP Komplex weisen auf Interaktionen von fünf sauren Resten in Helix 2 von ACP mit vier basischen Resten von AcpS hin (siehe Abb. 5.19). Der Sequenzvergleich von PCP^C mit ACPs zeigt, dass diese fünf sauren Aminosäuren in ACP konserviert sind (Siehe Abb. 2.9). Nun sollte anhand einer Punktmutationsanalyse dieser Reste ihre Bedeutung in Bezug auf die Spezifität der PPTase Reaktion und auf die Interaktion mit anderen NRPS-Domänen und -Modulen genauer untersucht werden.

Als Modellsystem für einmodulige NRPS-Systeme wurde ProCAT (TycB1) und für ein minimales, zweimoduliges NRPS-System ein bestehendes System aus den Enzymen TycA/ProCAT-LeuCAT-Te verwendet (Mootz *et al.*, 2000a). Das Protein ProCAT-LeuCAT-

Te setzt sich aus dem zweiten und zehnten (bestehend aus einer C-Domäne, einer Leucin-aktivierenden A-Domäne und PCP) Modul sowie der internen Thioesterase der Tyrocidin Synthetasen zusammen. Inkubiert man die Proteine TycA und ProCAT-LeuCAT-Te mit den Aminosäure- Substraten und ATP wird das Tripeptid FPL-(D-Phe-L-Pro-L-eu) synthetisiert. Dieses wird von PCP des LeuCAT-Moduls an den Serinrest der Te übertragen und anschließend durch Hydrolyse abgespalten (siehe Abb. 5.30). Als Alternative zu dieser Reaktion kann von den ersten beiden Modulen D-Phe-L-Pro-DKP gebildet werden. DKP und das Tripeptid FPL konnten mittels HPLC-MS analysiert werden (siehe 4.4.2.1).

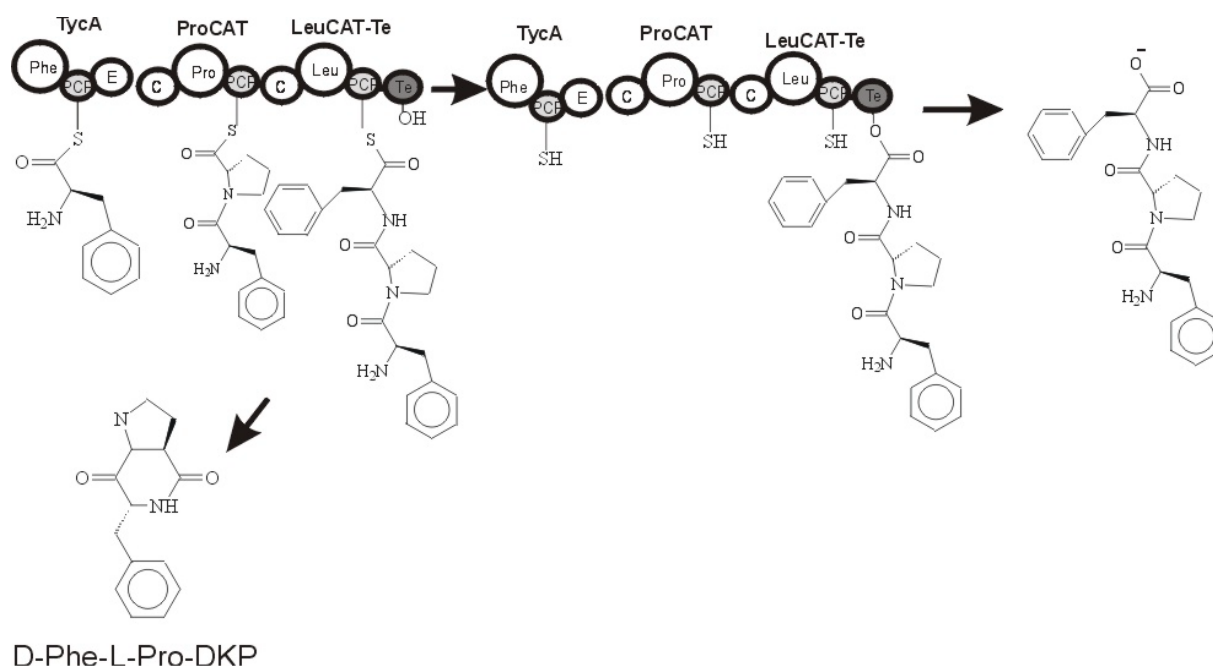


Abb. 5.30: Schematische Darstellung der DKP und FPL Produktion mit TycA und ProCAT-LeuCAT-Te. Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist das Tripeptid FPL. Nach der Peptidbindungsknüpfung von FPL wird auf den Serinrest im aktiven Zentrum der Te-Domäne übertragen und FPL wird als lineares Tripeptid abgespalten. Als Alternative dieser Reaktion kann D-Phe-L-Pro-DKP vom ersten der beiden Module gebildet werden (Mootz *et al.*, 2000a).

Es wurde lediglich in ProCAT auf die fünf Reste (H44, K47, A50, H56 und R57) in der α -Helix 2 von PCP konzentriert. Diese Reste des PCP wurden zu den entsprechenden Resten des ACP aus der FAS von *B. subtilis*, nämlich D35, D38, E41, E47 und D48, mutiert (Abb. 5.31). Hierbei wurden vier Mutanten konstruiert. Die V1-Mutante beinhaltet drei Punktmutationen, H44D, K47D und A50E, die V2-Mutante zwei Punktmutationen H56E und R57D und die V3-Mutante fünf Punktmutationen, H44D, K47D, A50E, H56E und R57D. Zwei weitere Mutanten, K47A und K47D, werden später behandelt (siehe 5.2.1.7).

Die Mutationen wurden nach der im Kapitel 4.1.2 beschriebenen Methode in das DNA-Templat pQE60-ProCAT oder pQE60-ProCAT-LeuCAT-Te (Mootz *et al.*, 2000a) eingeführt.

Bei der Konstruktion der V1-Mutante wurde das Primerpaar P56 und P57, bei der V2-Mutanten P58 und P59 verwendet (siehe Anhang Tabelle 8.3). Bei der Konstruktion der V3-Mutante wurde das Primerpaar P58 und P59 mit dem DNA-Templat pQE60-ProCATV1 oder pQE60-ProCATV1-LeuCAT-Te verwendet.

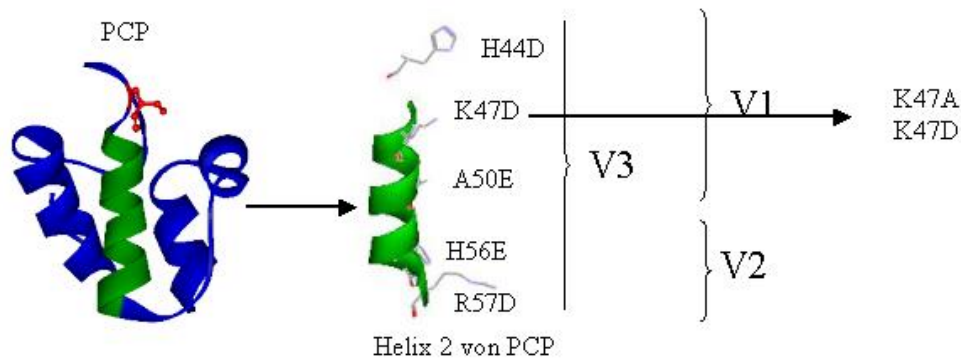


Abb. 5.31: Die vier Mutanten in PCP des ProCAT. Hier abgebildet ist die Struktur des Prototyps TycC3-PCP, dabei ist die α -Helix 2 grün markiert. Die fünf Reste des PCPs von ProCAT sind auf der Helix verteilt. Die Mutante V1 beinhaltet drei Punktmutation im N-terminalen Bereich der Helix 2 des PCPs, V2 beinhaltet 2 Punktmutationen in der C-terminalen Helix 2 und die Mutante V3 besteht aus fünf Punkt Mutationen (V1 + V2).

Alle sechs Konstrukte wurden zuerst auf ihre richtige Sequenz hin überprüft. *E.coli* M15 und *E. coli* BL21 wurden mit den Konstrukten transformiert und der beste Überexpressionsstamm wurde zur Protein überproduktion weiter verwendet. Die Reinigung der mit einem C-terminalen His₆-tag versehenen ProCAT, ProCAT-LeuCAT-Te und deren Mutanten wurde über Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt. Pro Liter Zellkultur konnten 7 mg der ProCAT-Mutanten (mit >90% Reinheit) und 5 mg der ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten (mit >80% Reinheit) erhalten werden (siehe Abb. 5.32).

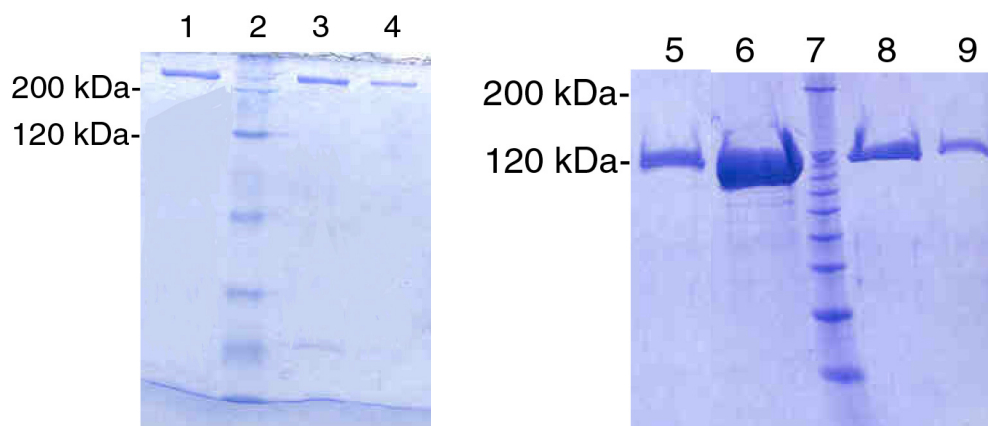


Abb. 5.32: SDS-Gel von gereinigten ProCAT-LeuCAT-Te- und ProCAT-Mutanten nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. (1) ProCATV1-LeuCAT-Te, (2) Proteinmarker (3) ProCATV2-LeuCAT-Te, (4) ProCATV3-LeuCAT-Te, (5) ProCATV3, (6) ProCAT, (7) Proteinmarker, (8) ProCATV1 und (9) ProCATV2.

5.2.1.6. Untersuchung der posttranslationalen Modifikation von ProCAT- und ProCAT-LeuCAT-Te-Mutanten:

Die vorherigen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von hPCP und hTycA zeigten, dass beide Proteine von AcpS und Sfp erkannt wurden. Nun sollten die neu konstruierten ProCAT Mutanten auf die Interaktion mit PPTasen untersucht werden. Hierbei wurden 1 μ M ProCAT- oder ProCAT-LeuCAT-Te-Mutanten bzw. die entsprechenden Proteine mit *wt*-Sequenzen mit 25 nM Sfp oder 25 nM AcpS in Priming-Assay Puffer mit 200 nM [3 H]-CoA, 20 μ M CoA und 10 mM MgCl₂ für 30 min bei 37°C inkubiert (siehe 4.3.1). In Abb. 5.33 ist das Ergebnis des Versuches graphisch dargestellt.

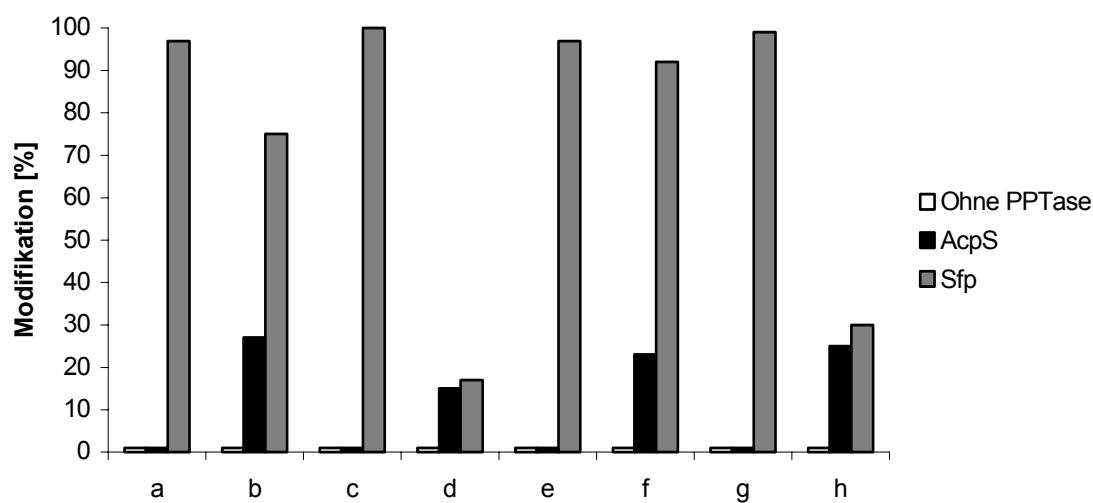


Abb. 5.33: Graphische Darstellung der posttranslationalen Modifikation der ProCAT Mutanten in ProCAT und ProCAT-LeuCAT-Te Konstrukten mit AcpS und Sfp. (a) ProCAT (Kontrolle) (b) ProCATV1, (c) ProCATV2, (d) ProCATV3, (e) ProCAT-LeuCAT-Te (Kontrolle) (f) ProCATV1-LeuCAT-Te, (g) ProCATV2-LeuCAT-Te und (h) ProCATV3-LeuCAT-Te.

Abb. 5.33 zeigt den qualitativen Test für die Punktmutanten. Die Punktmutanten ProCATV2 und ProCATV2-LeuCAT-Te wurden nur von Sfp *in vitro* modifiziert, wohingegen ProCATV1, ProCATV3, ProCATV1-LeuCAT-Te und ProCATV3-LeuCAT-Te sowohl von AcpS als auch von Sfp modifiziert wurden. Die Kontrolle mit den Ausgangsproteinen ProCAT und ProCAT-LeuCAT-Te zeigte, dass diese wie erwartet nur von Sfp modifiziert wurden. Eine Quantifizierung dieser Daten erfolgte nur für ProCATV1, ProCATV3 und ProCAT. Zu diesem Zweck wurden die Konzentration der jeweiligen Proteine im Bereich von 1 bis 100 μ M variiert. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 5.14 dargestellt.

Tabelle 5.14: Kinetische Konstanten für Sfp und AcpS mit ProCAT und dessen Mutanten V1 und V3 als Substrate.

Substrate	K_M [μM]		k_{cat} [min^{-1}]		k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]	
	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp
ProCAT	n.d.	$2,1 \pm 1$	n.d.	55 ± 1	n.d.	26,2
ProCATV1	$78,1 \pm 1$	$3,2 \pm 1$	7 ± 3	50 ± 1	0,09	15,6
ProCATV3	55 ± 2	$6,5 \pm 1$	15 ± 3	48 ± 1	0,27	7,4

n. d.: nicht detektierbar

Die katalytische Effizienz von AcpS mit ProCATV3 ist um den Faktor drei erhöht im Vergleich zu ProCATV1, zugleich ist die Effizienz von Sfp mit ProCATV3 um die Hälfte gesunken. Die Punktmutationen haben somit dazu geführt, dass die Erkennung durch AcpS verbessert wurde.

5.2.1.7. K47-Mutanten in TycC3-PCP und ProCAT

Der Sequenzvergleich der Carrier-Protein Superfamilie mit ProCATV1 zeigte konservierte Reste innerhalb der Helix 2 von PCP (siehe Abb. 2.12). Zum Beispiel ist Position 44 bei PCP^C immer Histidin, bei PCP^E immer Aspartat. In ProCATV1 wurden die folgenden Mutationen eingeführt: H44D, K47D und A50E. Die erhaltenen Mutanten wurden von AcpS aus *B. subtilis* erkannt und modifiziert. Aus dem Sequenzvergleich von PCP^E, PCP^C mit ACP wurde deutlich, dass in Position 47 des PCP fast immer positive geladene Rest wie K, R, selten polare Reste wie Q (die NH₂-Gruppe kann eine Wasserstoffbrücke mit R14 von AcpS bilden) vorkommen. Aus diesem Grund wurden die K47D und K47A Mutationen sowohl in TycC3-PCP als auch in ProCAT-PCP eingeführt. Hierfür dienten die Primerpaar P50 P51 und P52 P53 (siehe Anhang Tabelle 8.3) mit dem DNA-Templat pQE70-*TycC3PCP* für die Konstruktion von pQE70-*TycC3PCP*-K47A und pQE70-*TycC3PCP*-K47D Mutanten. Entsprechend dienten die Primerpaare P60 P61 und P62 P63 mit dem Plasmid pQE60-*ProCAT* zur Konstruktion von pQE60-*ProCAT*-K47A und pQE60-*ProCAT*-K47D. *E. coli* M15 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Die rekombinanten Proteine wurden über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Es wurden je 5 mg Protein pro Liter Zellkultur mit der ProCAT K47A und K47D Mutante (mit >90% Reinheit) und 2 mg/L mit der TycC3-PCP K47A und K47D Mutante (mit >90% Reinheit) erhalten (siehe Abb. 5.34). Interessanterweise zeigte das SDS-Gel von TycC3-PCP K47A und K47D je zwei Banden (für die apo- und holo-Form). Dies weist auf eine posttranslationale Modifikation

während der Expression in *E. coli* hin. Die Massenanalyse der Proteine mittels MALDI-TOF drei Stunden nach Induktion von PCP-K47D zeigte, dass während der Expression das gesamte Protein bereits in der holo-Form vorlag.

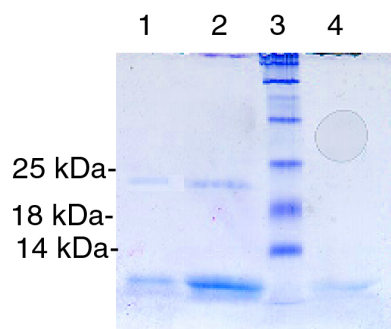


Abb. 5.34: SDS-Gel der gereinigten PCP-K47 Mutanten.
Dargestellt sind 1) PCP-K47A, 2) PCP-K47D, 3) Proteinleiter und 4) PCP.

Der qualitative Test für die Phosphopantetheinylierung der K47-Mutanten wurde wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde 1 μM CP im Reaktionsansatz verwendet. In Abb. 5.35 ist das Ergebnis des Versuches graphisch dargestellt.

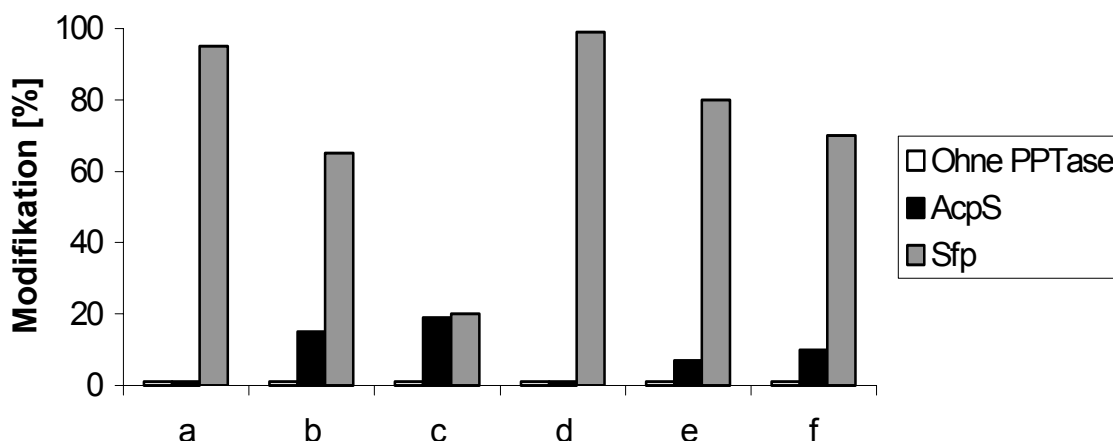


Abb. 5.35: Graphische Darstellung der posttranslationalen Modifikation der K47-Mutante von TycC3-PCP und ProCAT mit AcpS und Sfp. (a) PCP (Kontrolle) (b) PCP-K47A, (c) PCP-K47D, (d) ProCAT (Kontrolle), (e) ProCAT-K47A und (f) ProCAT-K47D. Die Farbkodierung: weiß: ohne Zugabe von PPTase, hellgrau: *in vitro* Modifikation mit Sfp und schwarz: *in vitro* Modifikation mit AcpS.

Alle K47 Mutanten von TycC3-PCP und ProCAT-PCP wurden *in vitro* von AcpS und Sfp modifiziert. Die Kontrolle mit den Ausgangskonstrukten zeigt, dass diese wie erwartet nur von Sfp modifiziert werden. Anschließend wurden quantitative Daten der Modifikation von TycC3-PCP K47A und K47D gemessen. Diese Daten sind in Tabelle 5.15 aufgelistet.

Tabelle 5.15: Kinetische Konstanten von K47 TycC3-PCP mit Sfp und AcpS.

Substrate	K_M [μM]		k_{cat} [min^{-1}]		k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]	
	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp	AcpS	Sfp
PCP-K47A (1-100 μM)	98 ± 9	$3,8 \pm 1$	2 ± 1	98 ± 2	0,02	25,8

PCP-K47D (1-100 μ M)	85 ± 8	$5,8 \pm 1$	5 ± 1	92 ± 5	0,06	15,9
-----------------------------	------------	-------------	-----------	------------	------	------

Aus Tabelle 5.15 geht hervor, dass sich die katalytische Effizienz von Sfp mit den K47-Mutanten kaum geändert hat im Vergleich zum *wt*-PCP. AcpS kann die Mutanten zwar modifizieren, zeigt jedoch im Vergleich zu ACP und hPCP eine 30 bis 90-fache (ACP), bzw. eine 10- bis 30-fache (hPCP) Verringerung der katalytischen Effizienz.

5.2.1.7. Biochemische Charakterisierung der ProCAT-Mutanten

Neben der Modifikation der PCP- und ProCAT-Mutanten durch PPTasen spielt auch die Interaktion mit anderen Domänen und Modulen eine entscheidende Rolle. Daher wurde die Interaktion von PCP mit der A- und C-Domäne *in cis* im Dimodul ProCAT-LeuCAT-Te und *in trans* die Kommunikation mit TycA untersucht.

5.2.1.7.1. Kommunikation zwischen den PCP-Mutanten und der A-Domäne in ProCAT

Die Interaktion des PCP mit der A-Domäne wurde durch kovalente Bindung von [14 C]-L-Pro an den 4'-Ppant untersucht. 1 μ M ProCAT-Mutanten oder zum Vergleich *wt*-ProCAT wurden mit 2 μ M [14 C]-L-Pro, 20 μ M CoA, 25 nM rekombinantem *B. subtilis* AcpS oder Sfp für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Präinkubation bei 37°C wurde zu der Mischung 5 mM ATP gegeben. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 5 min bei 37°C inkubiert.

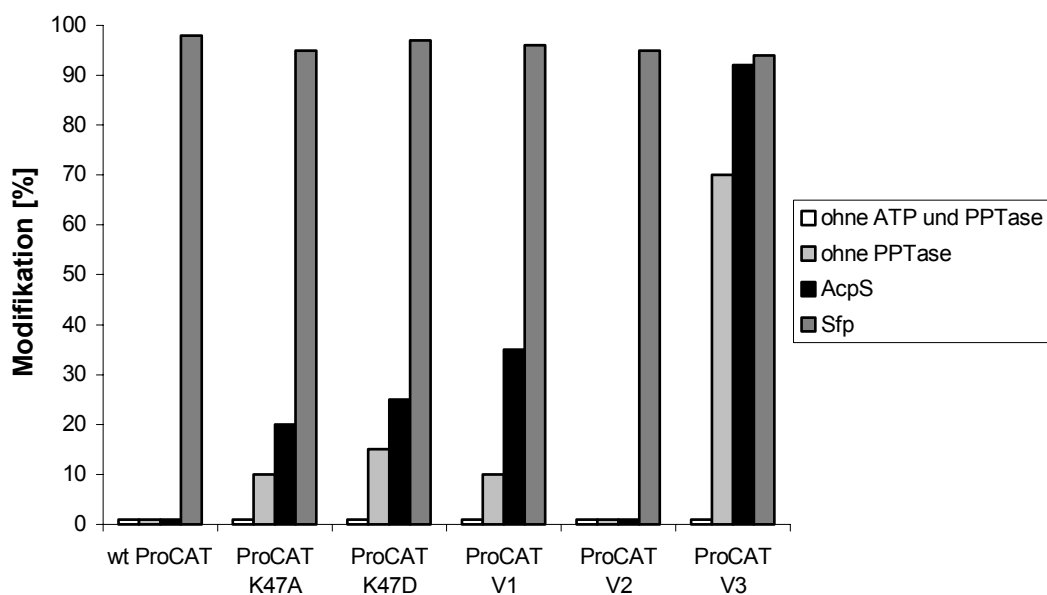


Abb. 5.36: Graphische Darstellung der posttranslationalen Modifikation von ProCAT *wt* und Mutanten mit AcpS und Sfp und anschließende Aminoacylierung mit [14 C]-L-Pro. Die Farbkodierung: weiß: ohne Zugabe von PPTase und ATP, hellgrau: ohne PPTase (*in vivo* Modifikation mit *E. coli* eigene AcpS), schwarz: *in vitro* Modifikation mit AcpS und dunkelgrau: *in vitro* Modifikation mit Sfp.

Aus Abb. 5.36 geht hervor, dass die ProCAT-Mutanten K47A, K47D, V1 und V3 mit 10, 15, 12 und 70 % *in vivo* während der Expression durch AcpS im *E. coli* modifiziert wurden. Das Kontrollexperiment zeigte, dass *wt*-ProCAT nur zu 1% während der Expression in *E. coli* zu holo-TycA modifiziert wurde. Die zusätzliche Inkubation von diesen Mutanten *in vitro* mit PPTase zeigte, dass ProCAT K47A, K47D, V1 und V3 von AcpS und Sfp erkannt und modifiziert wurden.

Die ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten wurden genauso wie oben beschrieben analysiert. Hierbei wurden bei den Mutanten ProCATV1-LeuCAT-Te und ProCATV3-LeuCAT-Te die gleichen Ergebnisse erzielt, sie konnten von AcpS *in vivo* und *in vitro* und von Sfp *in vitro* zur holo-Form umgewandelt werden. ProCATV2-LeuCAT-Te und ProCAT-LeuCAT-Te konnten nicht von AcpS modifiziert werden.

5.2.1.7.2. Protein-Protein Interaktion der ProCAT Mutanten *in trans* mit TycA und *in cis* mit TycC6(LeuCATTe)

Die in dieser Arbeit konstruierten ProCAT Mutanten sollten anschließend auf ihre Elongationsfähigkeit *in trans* mit dem nativen Partner von ProCAT, TycA, durch Nachweis des von den Protein-Templaten gebildeten D-Phe-L-Pro-DKP untersucht werden. Anschließend sollte eine Untersuchung *in cis* mit TycC6 (LeuCAT-Te) im dimodularen System ProCAT-LeuCAT-Te erfolgen (siehe Abb. 5.32). Zu diesem Zweck wurde TycA mit ProCAT oder ProCAT-LeuCAT-Te inkubiert. Die holo-Enzyme wurden getrennt mit L-Phe, bzw. L-Pro und ATP in Kondensierungspuffer bei 37 °C inkubiert. Das gebildete Produkt D-Phe-L-Pro-DKP wurde mittels HPLC-ESI-MS nachgewiesen und quantifiziert (siehe 4.4.2.1). Die Ergebnisse der Produktbildung sind in Abb.5.37 abgebildet.

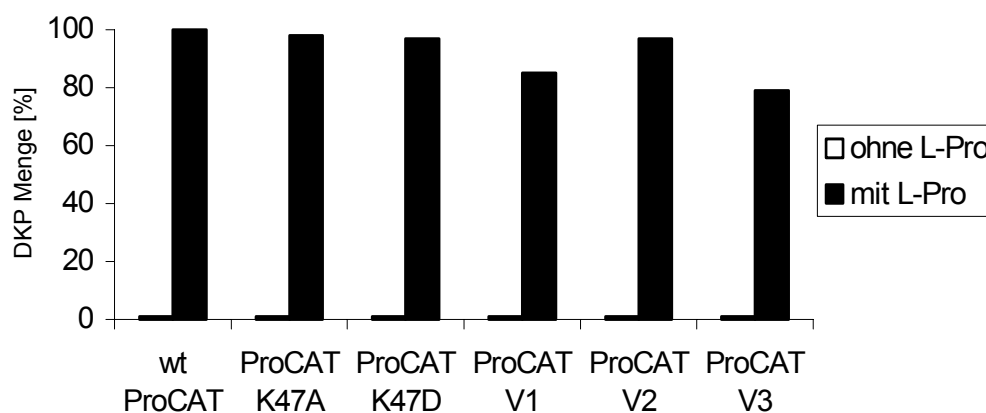


Abb. 5.37: D-Phe-L-Pro-DKP-Produktion von TycA mit ProCAT und deren Mutanten. Weiße Säulen repräsentieren den Reaktionsansatz ohne L-Pro (Negativkontrolle), schwarze Säulen zeigen die gebildete DKP-Menge in Prozent an. Die [%] DKP-Menge wurde auf die DKP-Menge bezogen, die von TycA mit *wt* ProCAT produziert wird.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass alle neu konstruierten ProCAT-Punktmutanten in der Lage sind in der Anwesenheit von TycA D-Phe-L-Pro-DKP Produkt zu bilden. Die Punktmutanten K47A, K47D und ProCATV2 produzieren fast soviel DKP wie *wt* ProCAT (97, 98 und 97% des *wt*, siehe Abb. 5.39); ProCATV1 und ProCATV3 bilden 85 und 79% DKP verglichen mit *wt* ProCAT. Die Untersuchung der dimodularen ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten mit TycA zeigt genau die gleich prozentuale D-Phe-L-Pro-DKP Produktbildung (siehe Tabelle 5.16). hTycA konnte sowohl mit ProCATV1-LeuCAT-Te als auch mit ProCATV3-LeuCAT-Te mit D-Phe, L-Pro und ATP D-Phe-L-Pro-DKP Produkt bilden (siehe Tabelle 5.16 und Abb. 5.38).

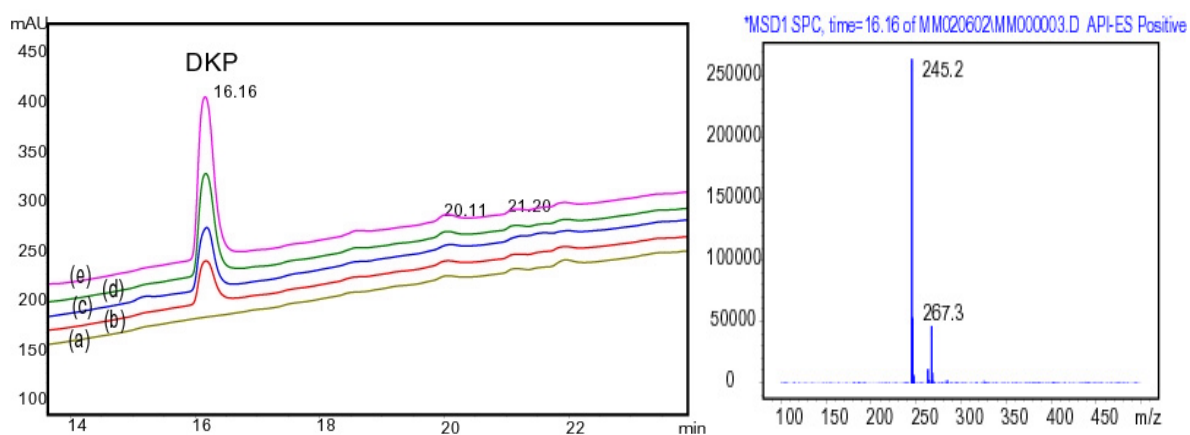


Abb. 5.38: HPLC-MS-ESI Chromatogramm des D-Phe-L-Pro-DKP Produktes von hTycA mit ProCAT-LeuCAT-Te (V1 und V3 Mutanten). Als Substrat wurde D-Phe und L-Pro mit beiden Enzymen inkubiert. Dargestellt sind: (a) hTycA mit ProCATV3-LeuCAT-Te ohne D-Phe, (b) hTycA mit ProCATV3-LeuCAT-Te mit D-Phe und L-Pro, (c) hTycA mit ProCATV1-LeuCAT-Te mit D-Phe und L-Pro, (d) hTycA mit ProCATV1-LeuCAT-Te mit D-Phe und L-Pro *in vitro* nachmodifiziert mit AcpS, (e) hTycA mit ProCATV3-LeuCAT-Te mit D-Phe und L-Pro *in vitro* nachmodifiziert mit AcpS.

Die ESI-MS Analyse des Produkts bei 16,16 min liefert ein Massesignal von $M^+ = 245,2$ Da übereinstimmend mit der berechneten Masse für D-Phe-L-Pro-DKP ($M^+ = 245$ Da) (Stachelhaus *et al.*, 1998). Die Masse von 267,3 Da ist das Natriumsalz von D-Phe-L-Pro-DKP. Die *in vivo* modifizierten und *in vitro* mit AcpS nachmodifizierten Enzyme sind in der Lage D-Phe-L-Pro-DKP (7 und 15 % bzw. 30 und 23% nach Modifikation *in vitro*) zu produzieren.

Im *in cis* Versuch wird die Bildung des Tripeptid-Produkts D-Phe-L-Pro-L-Leu (FPL) als Indikator für die Funktionalität eines trimodularen Systems genutzt. Das gebildete Tripeptid-Produkt wurde mittels HPLC-ESI-MS nachgewiesen und quantifiziert (siehe 4.4.2.1). Für die Quantifizierung wurde TycA mit den ProCAT-LeuCAT-Te-Mutanten oder ProCAT-LeuCAT-Te (als Positivkontrolle) eingesetzt. Die holo-Enzyme wurden mit L-Phe, L-Pro, L-Leu und ATP in Kondensierungspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.39

zusammengefasst, die qualitativen Ergebnisse für TycA mit ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten finden sich in Tabelle 5.16.

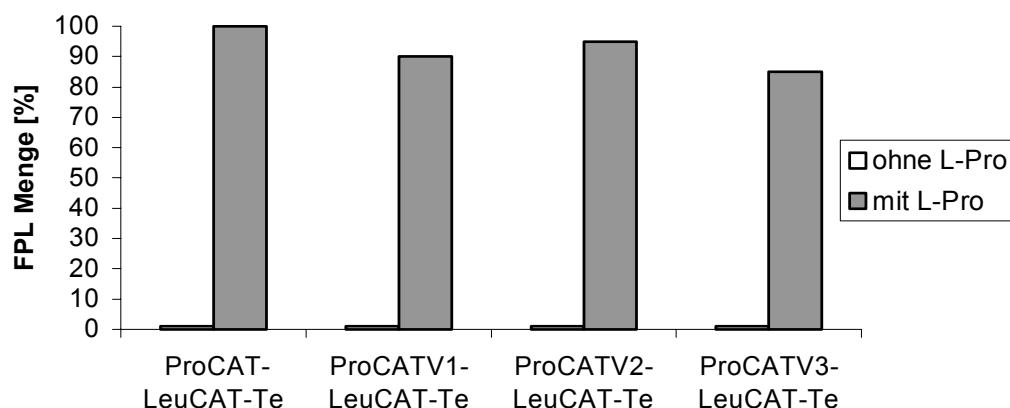


Abb. 5.39: Tripeptid FPL (D-Phe-L-Pro-L-Leu) -Produktion von TycA durch ProCAT-LeuCAT-Te und deren Mutanten. Weiße Säulen repräsentiert den Reaktionsansatz ohne L-Pro (als Negativkontrolle), die grauen Säulen zeigen die prozentuale FLP-Produktion im Vergleich zu den wildtyp-Enzymen.

Aus Abb. 5.39 wird deutlich, dass alle neu rekombinanten ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten in der Lage sind in Anwesenheit von TycA das Tripeptid D-Phe-L-Pro-L-Leu (FPL) als Produkt zu bilden. Tatsächlich produzieren die Mutanten ProCATV1, -V2 und -V3 -LeuCAT-Te fast ebensoviel FLP, wie das Ausgangskonstrukt ProCAT-LeuCAT-Te (90, 95 bzw. 85% des Ausgangskonstrukts).

Um die Kommunikation der ProCAT Punktmutanten mit anderen hybrid-PCP/ACP NRPS zu untersuchen, wurde die Bildung des Produkts D-Phe-L-Pro-DKP und D-Phe-L-Pro-L-Leu durch die ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten mit hTycA wie oben beschrieben verfolgt. Die Ergebnisse der Inkubation sind in Tabelle 5.16 dargestellt.

Tabelle 5.16: FPL- und (DKP)- Produktion und von hTycA und TycA mit ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten.

	TycA [%]				hTycA [%]			
	Ohne ATP und PPTase	Ohne ATP, mit PPTase	AcpS	Sfp	Ohne ATP und PPTase	Ohne ATP, mit PPTase	AcpS	Sfp
ProCAT-LeuCAT-Te	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	85 (25)
ProCATV1-LeuCAT-Te	0 (0)	0 (0)	0 (0)	90 (85)	0 (0)	0 (7)	0 (30)	79 (27)
ProCATV2-LeuCAT-Te	0 (0)	0 (0)	0 (0)	95 (97)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	80 (23)
ProCATV3-LeuCAT-Te	0 (0)	0 (0)	0 (0)	85 (79)	0 (0)	0 (15)	0 (23)	75 (22)

(Die Angaben beziehen sich auf DKP- bzw. FLP-Menge, die durch die wildtyp Proteine produziert wird.

Aus Abb. 5.40 geht hervor, dass alle ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten V1, V2 und V3 in Anwesenheit von TycA das Tripeptid FPL (D-Phe-L-Pro-L-Leu), mit 90, 95 bzw. 85% des Ausgangskonstruktes produzieren. Inkubiert man hTycA mit den ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten V1, V2 und V3 zeigt sich, dass alle diese Konstrukte sowohl das Tripeptid FPL (D-Phe-L-Pro-L-Leu), als auch das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP bilden. Hierbei wurde beobachtet, dass das *in vivo*, während der Expression posttranslational modifizierte hTycA mit ProCATV1-LeuCAT-Te oder ProCATV3-LeuCAT-Te ohne zusätzliche PPTase *in vitro* D-Phe-L-Pro-DKP produzieren. Durch nachträgliche Modifikation mit AcpS *in vitro* produzieren diese beide Konstrukte nur das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP, wird hingegen mit Sfp nachmodifiziert, bilden die gleichen Konstrukte das Tripeptid D-Phe-L-Pro-L-Leu. Es kann also durch gezielte Auswahl der PPTase die Bildung des Produkts gesteuert werden.

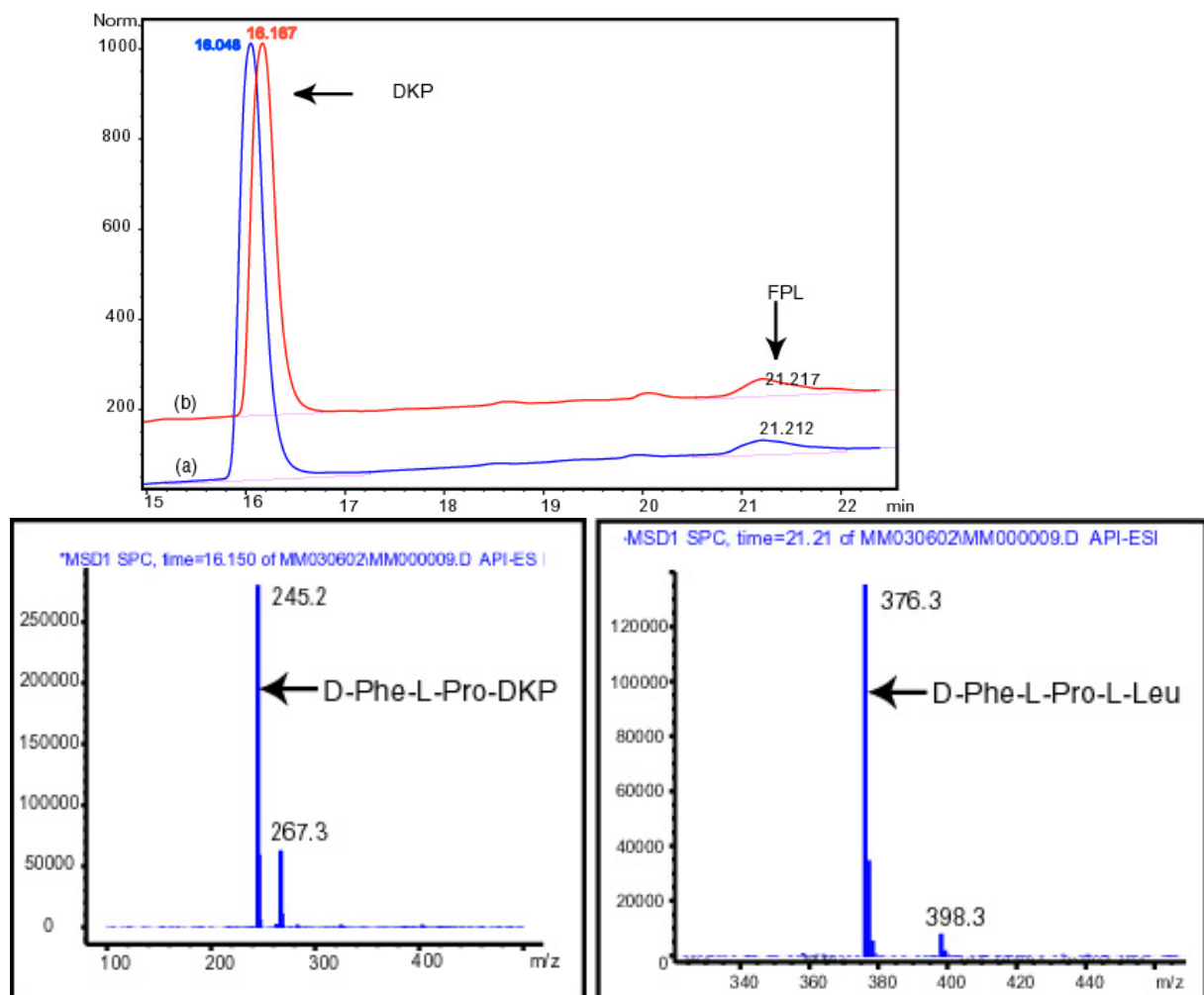


Abb. 5.40: HPLC-MS-ESI Chromatogramm des FPL (D-Phe-L-Pro-L-Leu) und D-Phe-L-Pro-DKP Produktes von hTycA mit ProCAT-LeuCAT-Te und der V3 Mutante. Beide Enzyme wurden mit D-Phe, L-Pro und L-Leu inkubiert. Dargestellt sind: (a) hTycA mit ProCAT-LeuCAT-Te, (b) hTycA mit ProCATV3-LeuCAT-Te. Die Ausgangskonstrukte in Kombination mit den ProCATV3-LeuCAT-Te Mutanten bilden zusammen mit hTycA beide Produkte.

Die ESI-MS Analyse des Produkts bei 16,15 min liefert ein Massesignal von $M^+ = 245,2$ Da das mit der für D-Phe-L-Pro-DKP errechneten Masse übereinstimmt ($M^+ = 245$ Da) (Stachelhaus *et al.*, 1998), das Produkt bei 21,21 min liefert ein Massesignal von $M^+ = 376,3$ Da das mit der für D-Phe-L-Pro-L-Leu errechneten Masse übereinstimmt ($M^+ = 376$ Da) (Mootz *et al.*, 2000a).

Mootz und Mitarbeiter haben gezeigt, dass das System TycA/ProCAT-LeuCAT-Te neben dem Tripeptid D-Phe-L-Pro-L-Leu auch das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP bilden kann, dies wurde auch bei der Analyse von TycA oder hTycA mit ProCAT-LeuCAT-Te Mutanten beobachtet (siehe Abb. 5.40) (Mootz *et al.*, 2000a).

5.2.2. Konstruktion einer PCP-Verkürzungsmutante

Ein entscheidendes Kriterium für die Konstruktion von NRPS-Hybridproteinen ist die Wahl der Domänengrenzen. Um die PCP-Domäne innerhalb eines Moduls besser von der A-Domäne abgrenzen zu können, wurden zwei Verkürzungsmutanten von PCP hergestellt. Dazu wurde PCP um 5 bzw. 9 As N-terminal verkürzt. Diese Verkürzungen wurden aufgrund der NMR-Struktur des TycC3-PCP in Kombination mit einem Sequenzvergleich mit mehr als 100 PCP-Domänen gewählt (Doekel and Marahiel, 2000). Die NMR-Struktur zeigte eine nicht definierte Schleife von As 2-7, gefolgt von einer definierten Schleife von As 8-16, innerhalb derer drei Reste hochkonserviert sind (siehe Abb 5.41). Als ersten Hinweis, ob bei dieser Verkürzung die Funktionalität von PCP beeinflusst wird, wurde die Modifikation durch eine PPTase gewählt.

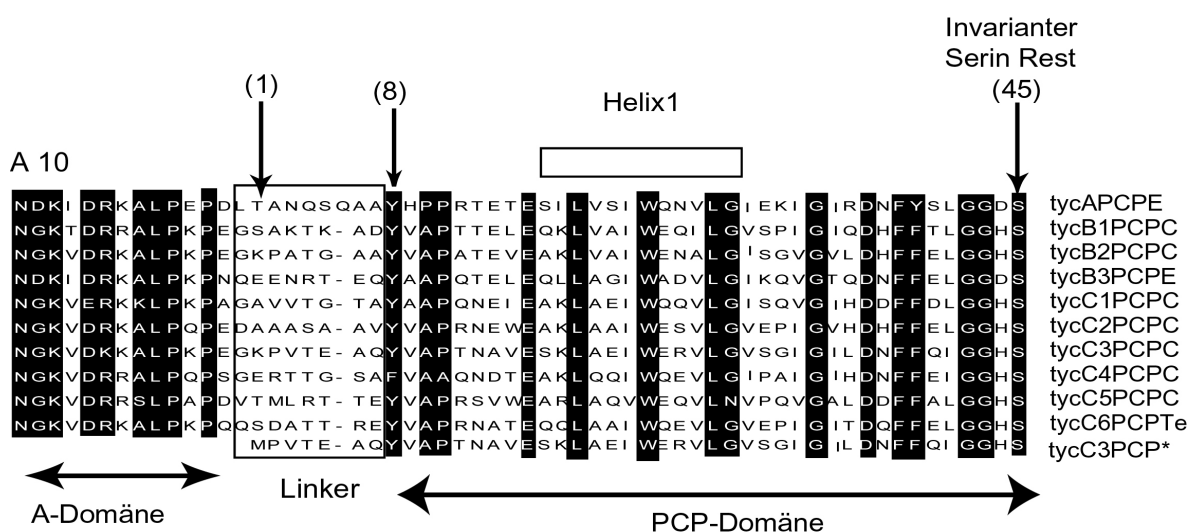


Abb. 5.41: Der Sequenzvergleich von PCP aus der Tyrocidin Synthetase. Dargestellt sind die Sequenzen von PCPs aus Tyrocidin-Synthetase aus *B. brevis*. Hochkonservierte Reste sind schwarz unterlegt. Die zwei Boxen oberhalb des Sequenzvergleichs repräsentieren die Helices, die durch die NMR-Struktur des TycC3-PCP definiert wurden. Die weiße Box innerhalb der Sequenz markiert die vermutete Linker-Region zwischen A- und PCP-Domäne (Doekel and Marahiel, 2000). Der invariante Serinrest ist vor Helix 2 des PCPs lokalisiert.

Die Verkürzungsmutanten von TycC3-PCP wurden auf DNA-Ebene mit den Primerpaaren P43 P45 bzw. P44 P45 (siehe Anhang Tabelle 8.3) unter Verwendung von pQE70-TycC3PCP (Weber *et al.*, 2000) als DNA-Templat konstruiert, sie werden im weiteren mit VKM5 und VKM9 bezeichnet. VKM5 enthält an Position 6 Methionin anstelle Alanin, das konservierte Tyrosin 8, Alanin 10 und Prolin 11 sind erhalten geblieben. In VKM9 wurde Valin 9 durch Methionin ersetzt, daher sind lediglich das konservierte Alanin 10 und Prolin 11 erhalten geblieben. *E. coli* M15 wurde zur Proteinexpression mit dem Plasmid pQE70-VKM5-TycC3-PCP oder pQE70-VKM9-TycC3-PCP transformiert. Die wichtigsten Daten der TycC3-PCP Verkürzungsmutanten sind in der Tabelle 5.17 zusammengefasst.

Tabelle 5.17: Daten zu den TycC3-PCP Verkürzungsmutanten

Name	Länge (As)	Molekulargewicht (Da)	pI-Wert
VKM5-TycC3-PCP	86	9606	8,59
VKM9-TycC3-PCP	82	9144	8,63

Die Expression der Mutanten erfolgte bei 28 °C. Aufgrund von Unlöslichkeit wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und anschließend rückgefaltet (siehe 4.2.6). Abb. 5.42 zeigt das SDS-PAGE-Gel der gereinigten Mutanten.

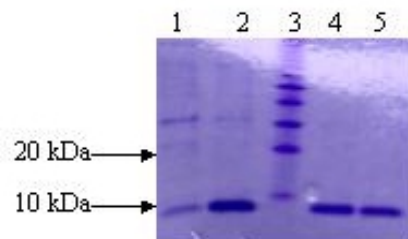


Abb. 5.42: SDS-Gel der unter denaturierenden Bedingungen gereinigten TycC3-PCP Verkürzungsmutanten. (1) VKM5 wurde mit Puffer D eluiert, (2) VKM5 wurde mit Puffer E eluiert, (3) 10 kDa Leiter, (4) VKM9 wurde mit Puffer D eluiert und (5) VKM9 wurde mit Puffer E eluiert (siehe 4.2.5).

Die rückgefalteten apo-Verkürzungsmutanten wurden als Substrate für Sfp verwendet. Die HPLC-Analyse der VKM5- und VKM9-TycC3-PCP zeigt, dass in beiden Fällen 5% des Proteins während der Expression zur holo-Form modifiziert worden waren und dass sie mit Sfp *in vitro* zu 100% holo-Form modifiziert werden konnten (siehe Abb. 5.43).

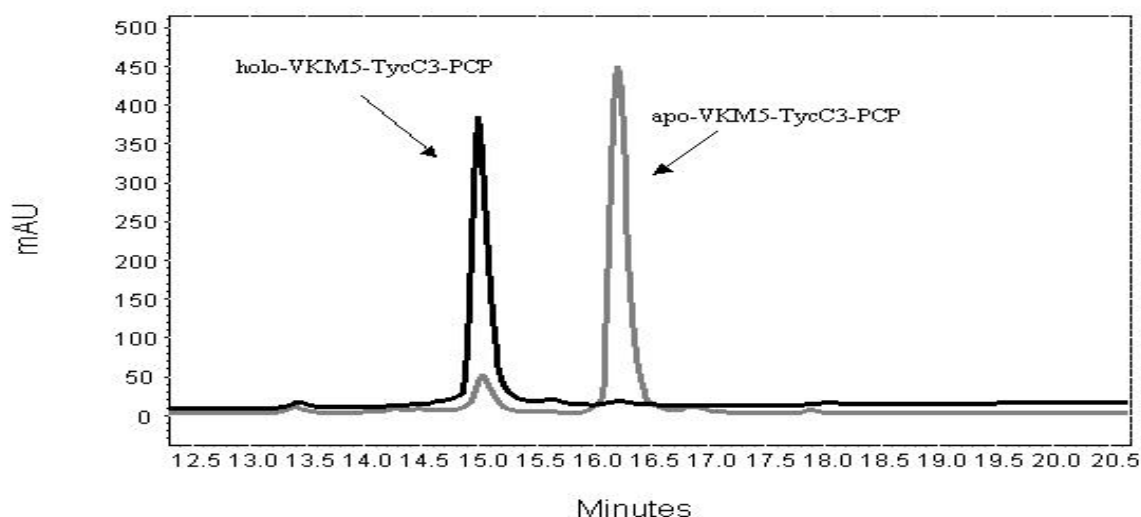


Abb. 5.43: HPLC-Analyse von VKM5-TycC3-PCP. Grau dargestellt ist das Protein nach Expression und schwarz nach Nachmodifizierung mit Sfp.

Zur Bestimmung von K_M - und k_{cat} -Werten der Verkürzungsmutanten mittels HPLC wurde wie bei PCP beschrieben verfahren (siehe 4.4.2.2). Die Konzentration von VKM5- und VKM9-TycC3-PCP wurde im Bereich von 1 bis 100 μM variiert. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 5.18 dargestellt.

Tabelle 5.18: Kinetische Daten von Sfp mit den TycC3-PCP Verkürzungsmutanten

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
VKM5-TycC3-PCP	$5,5 \pm 1$	99 ± 4	18
VKM9TycC3-PCP	$6,2 \pm 1$	89 ± 4	14,3

Die katalytische Effizienz von Sfp mit den Verkürzungsmutanten ist, wie in Tabelle 5.18 zu sehen, fast ebenso groß wie bei TycC3-PCP mit $21 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$. Dieser geringe Unterschied könnte auf einem Anteil von nicht vollständig zurückgefaltetem Protein beruhen.

5.3. Strukturanalyse der E-Domäne und TEII

Die angestrebte 3D-Strukturanalyse von NRPS unterteilt sich in Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie. Zu Beginn der Dissertation, waren lediglich die Kristallstrukturanalyse der A-Domäne der Gramacidin-Synthetase S (GrsA) abgeschlossen (PDB-Code 1AMU) (Conti *et al.*, 1997). Während der Promotionsarbeit wurden jedoch weitere 3D-Strukturen gelöst, die das Verständnis über den Reaktionsmechanismus von NRPS erheblich erweiterten. Besonders interessant war in dem Kontext der vorliegenden Arbeit die Kristallstruktur der C-Domäne der Vibriobactin-Synthetase (VibH) (PDB-Code 1L5A) (Keating *et al.*, 2002).

Keating und Mitarbeitern schlagen diese Struktur als repräsentative Struktur für Kondensierungs-, Zyklisierungs- und Epimerisierungs-Domänen in NRPS vor. Die kinetischen Untersuchungen von VibH und dessen Mutanten weisen jedoch deutliche Unterschiede für den Reaktionsmechanismus im Vergleich zu allen bis jetzt untersuchten Kondensierungsenzymen wie TycB1, VibFC2, CAT und E2p auf (Bergendahl *et al.*, 2002; de Crécy-Lagard *et al.*, 1995; Keating *et al.*, 2002; Lewendon *et al.*, 1994; Marshall *et al.*, 2002b). Aus diesem Grund scheint die Bestimmung einer Struktur einer E-Domäne einen wichtigen Ansatz zur Erklärung des Reaktionsmechanismus der Epimerisierungsdomäne und der Protein-Protein-Interaktionen für Epimerisierungs-, Kondensierungs- und Zyklisierungs-Reaktionen in NRPS zu sein. Auf Primärstrukturebene zeigt TycB3-E 13% Homologie zur angesprochenen C-Domäne VibH (Keating *et al.*, 2002). Die E-Domäne von TycA zeigt eine Homologie von 13% zu VibH und 51% zu TycB3. Beide Proteine wurden aufgrund ihrer intensiven biochemischen Charakterisierung (Linne *et al.*, 2001; Luo L *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2001; Stachelhaus and Walsh, 2000; Stein, 2002) in den folgenden Kristallisationsversuchen eingesetzt.

Eine weitere sehr interessante Domäne, die in jüngster Zeit in den Focus der NRPS Forschung gerückt ist, sind die Thioesterasen des Typs II (Kim *et al.*, 2002; Schwarzer *et al.*, 2002).

Bis jetzt existieren nur zwei Strukturen von den sogenannten TEII aus *E. coli* und *Vibrio harveyi*. Die TEII aus *E. coli* ist eine Acyl-CoA Thioesterase und kommt als Tetramer vor (Li J *et al.*, 2000; Naggert J *et al.*, 1991) *Vibrio harveyi* besitzt die Mystirol-ACP-Thioesterase, dem Struktur die von Lawson und Mitarbeitern aufgeklärt wurde (Lawson *et al.*, 1994). Beide TEII Proteine haben weniger als 8% Homologie auf Primärstrukturebene zu den TE II aus NRPS und beinhalten nicht das hoch konservierte Core-Motive GxSxG (siehe Anhang Tabelle 8.1.1). Deshalb sind die beiden Strukturen nicht repräsentativ für TEII, die mit NRPS und PKS assoziiert dar. Damit rückte TEII automatisch als weiteres Enzym in das Interesse der Strukturaufklärung. Ebenfalls aufgrund der detaillierten Untersuchungen wurde die Srf-TE II als ein lohnendes Ziel für die Strukturaufklärung ausgesucht.

5.3.1. Strukturstudien anderer rekombinanter NRPS-Fragmente:

Die E-Domänen und TEII wurden zuerst durch Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Superflow) und anschließend durch Gelfiltration gereinigt.

Insgesamt wurden zwei E-Domänen (TycA und TycB3), die Bidomäne PCP-E (TycA) und eine TEII (Srf-TE) für die Kristallisation eingesetzt. Die wichtigsten Daten zu diesen Proteinen sind Tabelle 5.19 zu entnehmen.

Tabelle 5.19: Wichtigste Daten zu den rekombinanten NRPS-Proteinen.

Name	Domänenart	Länge (As)	Molekular-Gewicht (Da)
TycA-E	E-Domäne	500	56812
TycB3-E	E-Domäne	488	55832
TycA-PCP-E	Peptidyl-Carrier-Protein und E-Domäne	578	65626
Srf-TE (II)	Thioesterase des Typs II	251	28772

PCP-E aus TycA wurde als apo-Protein produziert und bei Bedarf *in vitro* mit Sfp zur holo-Form umgewandelt. Anschließend wurde die PCP-E Bidomäne durch Gelfiltration von Sfp, CoA und MgCl₂ abgetrennt. In Abb. 5.44 ist das typische Aufreinigungsmuster am Beispiel der TycB3 E-Domäne zu sehen.

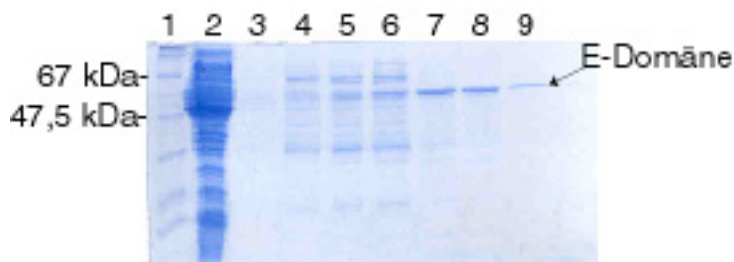


Abb. 5.44: SDS-Gel der E-Domäne TycB3-E. Dargestellt sind (1) Proteinmarker, (2) Überstand und von (3) bis (9) verschiedene gereinigte Fraktionen.

5.3.1.1. Kristallisation

Im Kristallisationsscreening von den eingesetzten Domänen wurden, nur bei der E-Domäne aus TycB3 Kristalle beobachtet. Kristalle bildeten sich nach 4 Tage bei 0,1 M NaAc, pH 4,6, und 1,2 M Natrium-formiat bei 4°C. Die Kristalle erreichten ihre maximale Größe nach zwei Wochen. Die Kristalle sind hexagonal plattenförmig mit einer Größe von $\sim 0,15 \times 0,08 \times 0,02$ mm (Abb. 5.45).



Abb. 5.45 Kristall der Epimerisierungs-(E)-Domäne TycB3-E aus *B. brevis*. Die Kristalle sind hexagonal plattenförmig.

Als Cryopuffer bewährte sich 30% Glycerol, 2,5 M Natrium-formiat pH 5,0. Die Kristalle wurden unter Tiefsttemperaturen vermessen (siehe 4.4.6.1) Die Daten wurden mit dem Program DENZO (Otwinowski, 1993) indexiert. Die Auflösung des Kristalls beträgt 3,5 Å. Für die Bestimmung der Phase innerhalb des Kristalls wurde Selenomethionin markiertes Protein hergestellt und gereinigt. Die MALDI-TOF Analyse zeigte, dass alle neun Methionine durch Selenomethionin ersetzt wurden. Die Se-Methionin-markiertes -TycB3-E-Domäne wurde unter gleichen Bedingungen bei 4 °C kristallisiert. Die Kristalle weisen die gleiche Morphologie auf, wie die nicht markierte TycB3-Epimerisierungsdomäne und streuen bis maximal 3,5 Å Auflösung.

5.3.2. Strukturbestimmung von TEII Srf-TE

Die biochemischen Untersuchungen von TEII von Schwarzer und Mitarbeitern (Schwarzer *et al.*, 2002) sowie Schroeder und Mitarbeitern (Schroeder, 2002) zeigen die ersten Ansätze zur Lösung des Reaktionsmechanismus. Die AS Ser86, His216 und Asp190 spielen dabei offensichtlich eine besondere Rolle und lassen eine typische katalytische Triade vermuten.

Da die externe Thioesterase (TEII) der Surfactin-Synthetase (Srf-TE) nicht kristallisiert werden konnte, wurde versucht durch NMR-Spektroskopie die Struktur zu ermitteln (in Kooperation mit Dr. Frank Bernhard, Biozentrum Frankfurt). Die Srf-TEII wurde in *E. coli* M15 überproduziert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Es wurden im Mittel 15 mg Protein per Liter Medium erhalten. Aus der Gelfiltration geht hervor, dass die TEII monomer vorkommt (siehe Abb.5.45).

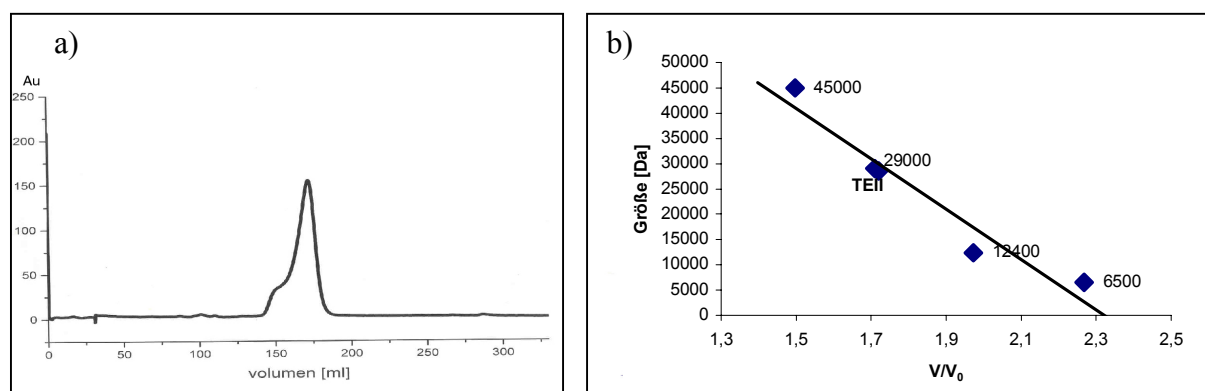


Abb. 5.45: Gelfiltration von TEII und Kalibrierung von Superdex 75. a) Gelfiltration von TEII Srf-TE und b) Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex G75 26/60. Hierbei wurde zu der Kalibrierung der Superdex Säule Aprotinin (6.5kDa), Cytochrom C (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ei-Albumin (45 kDa) und Ferritin (450 kDa) als Eichproteine verwendet (Finking, 2000). Als V₀ (108 mL) diente das Ausschlussvolumen von Ferritin.

Um optimale NMR-Bedingungen für die Messung zu erhalten, wurde die Stabilität des Proteins bei verschiedenen pH-Werten (4,5-8,0) untersucht.

Hierbei stellte sich heraus, dass die TEII bei einer Konzentration von 30 mg/mL (ca. 1 mM) im pH-Bereich 6,25-8,0 bei 25°C gut löslich ist, und bei einem pH-Wert von 6,75 über eine Woche bei 25°C in Lösung bleibt. Das CD-Spektrum der TEII in 50 mM Natrium-phosphat bei pH 6,75 zeigte, dass das Protein aus 58 % α -Helix und 39 % β -Faltblatt besteht. In Abb. 5.46 ist das CD-Spektrum der TEII dargestellt.

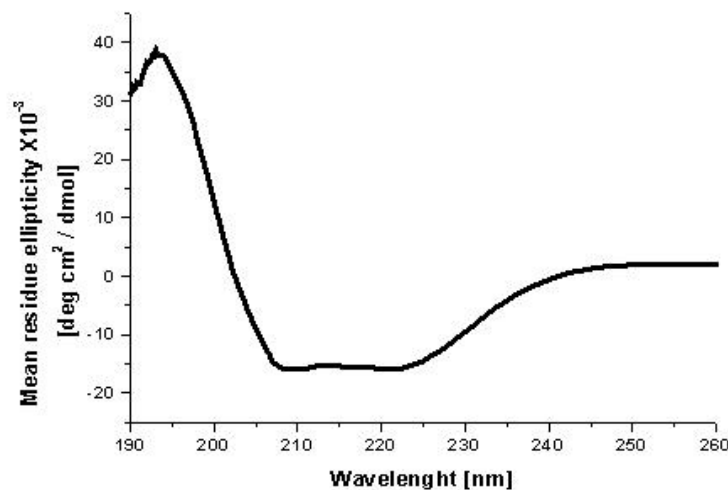


Abb. 5.46: CD-Spektrum von TEII. Das CD-Spektrum von 10 μ M TEII aus Srf-TE *B. subtilis* in 50 mM Natrium-phosphat bei pH 6,75 ist graphisch dargestellt.

Als nächstes wurde einfach ^{15}N -markiertes, zweifach markiertes ^{15}N und ^2H und dreifach markiertes ^{15}N , ^2H und ^{13}C Protein produziert, gereinigt und entsprechende Spektren aufgenommen ([^{15}N , ^1H]-TROSY; ^{15}N ; [$2\text{D-}^{15}\text{N}$]- NOESY-HSQC [$^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$]-NOESY-HSQC). Die Spektren wurden von Dr. Frank Bernhard bei 700 MHz, 20 bis 25°C im pH Bereich von 6,8 bis 7,4 aufgenommen und werden dem nächst ausgewertet. In Anhang 8.4 ist exemplarisch das [^{15}N , ^1H]-TROSY-Spektrum dargestellt.

Diskussion und Ausblick

6.1. Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase)

6.1.1. Die Bedeutung der PPTasen

Der 4'-Phosphopantetheinrest (4'-Ppant) ist der essentielle Kofaktor mehrerer Multienzymkomplexe, wie den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), den Polyketidsynthasen (PKS) und den Fettsäuresynthasen (FAS). Die FAS sind am Primärstoffwechsel, PKS und NRPS dagegen am Sekundärstoffwechsel von Prokaryoten und Eukaryonten beteiligt. Der 4'-Ppant-Rest ist dabei in allen diesen drei Multienzymkomplexe kovalent an einen invarianten Serinrest im Core T des sogenannten Carrier-Proteins (CP) über seine 3'-Phosphatgruppe als Phosphodiester gebunden (siehe Abb. 2.17a). Die 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (4'-PPTasen) übertragen den 4'-Ppant-Anteil von CoA auf die CP und überführen damit das Carrier-Protein von seiner inaktiven apo- in die aktive holo-Form (siehe Abb. 2.7). Aus diesem Grund sind die PPTasen essentielle Bestandteile für die nichtribosomale Peptid-, Polyketid- und Fettsäurebiosynthese. Die je nach Multienzymkomplex (NRPS, PKS oder FAS) aktivierten Intermediate (Aminoacyl-, Acetyl- und Malonyl-Gruppen) werden an der freien Thiol-Gruppe des Cysteaminrestes des 4'-Ppant als Thioester gebunden. Der 4'-Ppant bietet zwei wichtige Vorteile für den Biosyntheseweg in diesen Multienzymkomplexen: Erstens dient der ca. 20Å lange 4'-Phosphopantetheinrest als flexibles Interface, das die gebundenen Intermediate von einem katalytischen Zentrum zum nächsten transportiert. Zweitens sind die gebundenen Intermediate energiereiche Thioester-Verbindungen, deren Spaltung einen Energiegewinn für das System bedeutet.

In früheren Untersuchungen, bei denen die Substratspezifität der PPTasen als Unterscheidungsmerkmal herangezogen wurde, konnten die PPTasen in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, den AcpS-, Sfp- und FAS2-Typ (siehe Einleitung 2.4) (Fichtlscherer *et al.*, 2000; Lambalot and Walsh, 1996; Mootz *et al.*, 2002a). Mit Hilfe von Sequenzalignments wurden die PPTasen der drei oben genannten Gruppen genauer untersucht. Die Sequenzanalysen ergaben dabei, dass drei Core-Motive (P1, P2 und P3, siehe Anhang, Abb. 2.18) in allen drei Gruppen vorkommen. Im Gegensatz zu den PPTasen des AcpS- und FAS2-Typs, die mit dem Core-Motiv P2 (VI)GxD(VI) beginnen, findet man in PPTasen des Sfp-Typs zuerst das P1 Motiv, dann das P2 Motiv und schließlich im gleichen

Abstand wie im AcpS- und FAS2-Typ das P3-Motiv. Die Analyse der Strukturdaten von AcpS und Sfp zeigen, dass diese drei Core-Motive an der CoA-Bindung beteiligt sind.

6.1.2. Vielfältige Einsatzmöglichkeiten der PPTase Sfp

Frühere Untersuchungen von Sfp zeigten, dass Sfp eine breite Substratspezifität besitzt. Sfp kann als eine der wenigen PPTasen (wie Gsp aus *B. brevis*, Bli aus *B. licheniformis* und PcpS aus *P. aeruginosa*) verschiedene apo-CP aus NRPS, PKS und FAS, bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs, in die aktive holo-Form umwandeln (Finking *et al.*, 2002; Kealey *et al.*, 1998; Lambalot *et al.*, 1996; Mofid *et al.*, 1999; Mootz *et al.*, 2001). Mittlerweile hat sich Sfp als Standard Enzym für die Modifikation neu entdeckter CP oder schon bekannter CP etabliert und gehört somit zu der am häufigsten eingesetzten PPTase für die *in vivo* und *in vitro* Modifikation.

Sfp kann in *E. coli* sowohl auf einem Plasmid wie (pREP4-*sfp*) als auch im Chromosom integriert (*E. coli* HM0079 und *E. coli* BAP1) koexprimiert werden und dabei die NRPS- oder PKS-Proteine modifizieren (Mofid, 1999a; Mootz, 1999; Pfeifer *et al.*, 2001). Ein Beispiel hierfür ist die Modifizierung der 6-Deoxyerythronolid Synthase (6-DEBS), dem Vorläufer des Erythromycins, welches in *E. coli* BAP1 durch das chromosomale Sfp in die aktive holo-Form überführt wird. (Pfeifer *et al.*, 2001). Ein Beispiel für einen *B. subtilis* Stamm, der eine heterologe Produktion von NRPS-Produkten ermöglichen, ist *B. subtilis* KE30. Ein Derivat von *B. subtilis* KE30 stellt *B. subtilis* KE360 dar. Diese Stämme wurden benutzt, um den Biosynthesekuster Bacitracin (enthält keine PPTase Bli) *in vivo* heterolog in aktiver Form zu produzieren und dabei das Produkt Bacitracin herzustellen (Eppelmann *et al.*, 2001). Die mögliche Anwendung von Sfp zur Produktion neuer Antibiotika, die auf der Basis von NRPS oder PKS synthetisiert werden, konnte so eindrucksvoll verdeutlicht werden.

6.1.3. Strukturvergleich von Sfp mit AcpS

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PPTasen des Sfp-Typs mit denen des AcpS- und FAS2-Typs zeigte, dass die zweite Hälfte der Aminosäuresequenz von Sfp-Typ-PPTasen Sequenzhomologien zu Vertretern der beiden anderen Gruppen aufweist. Eine Auswertung der Aminosäurezusammensetzung lieferte als (weiteren) großen Unterschied zwischen den drei PPTase-Klassen den isoelektrische Punkt: Während der AcpS-Typ mit einem pI-Wert von 9,6 ausgesprochen basisch ist, ist der Sfp- und FAS2-Typ (bezogen auf den PPTasen-Anteil von FAS2) mit einem pI-Wert von 5,7 bzw. 5,2 eher sauer. Dieser Unterschied schlägt

sich erwartungsgemäß in der Oberflächenladung der Proteine nieder. Vermutlich sind aus diesem Grund die Substrat-CP in ihrem isoelektrischen Punkt an den jeweiligen PPTase-Typ angepasst. Die Substrate des AcpS-Typs sind ACP der Fettsäuresynthase mit einem pI-Wert von 3,8, während Sfp-Typ PCP einen pI-Wert von 6,3 und FAS2-Typ ACP mit einem pI-Wert von 5,7 aufweisen.

Als erste Struktur einer PPTase wurde die drei dimensionale Struktur von Sfp aus *B. subtilis* gelöst (Reuter *et al.*, 1999), kurze Zeit später die Strukturen des AcpS-Typs, AcpS aus *B. subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* (Chirgadze *et al.*, 2000; Parris *et al.*, 2000). Die Analyse der Kristallstrukturen zeigte, dass Sfp als pseudo-Homodimer vorliegt, während die beiden AcpS-PPTasen Trimere bilden (siehe Abb. 6.1). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Gelfiltrationsexperimenten, die im Zuge der Reinigungen dieser drei Proteine durchgeführt wurden.

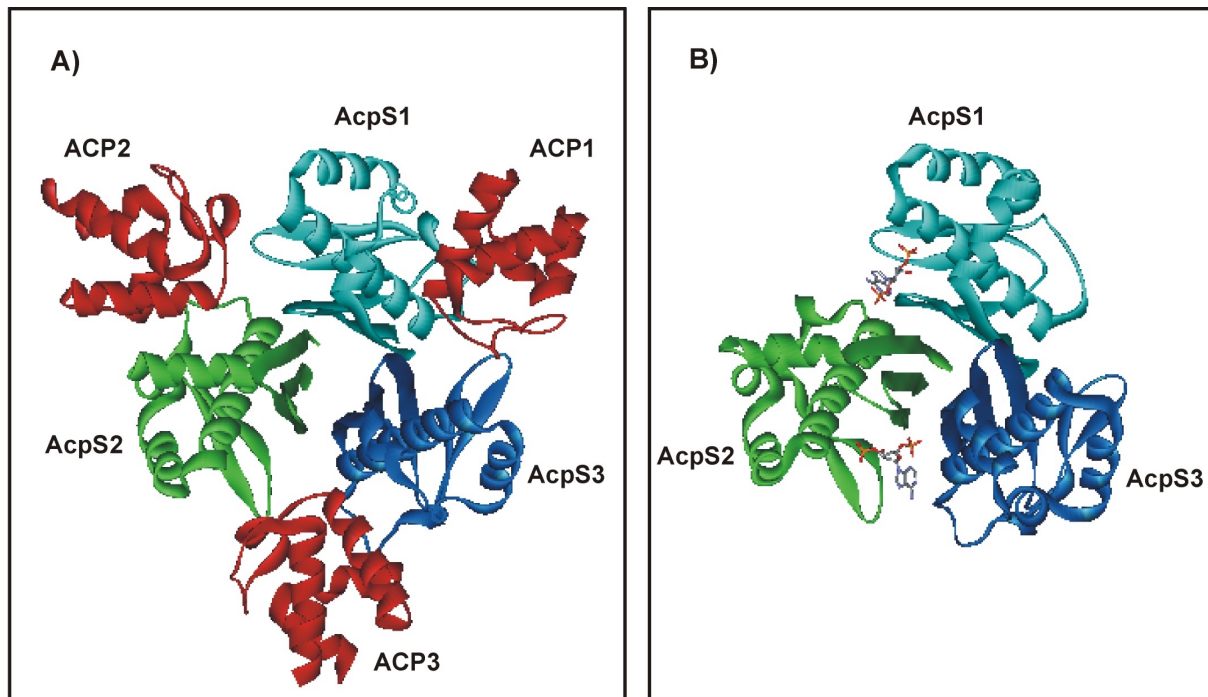


Abb. 6.1: Ribbon-Diagramm von PPTasen des AcpS-Typs. Die drei monomere Faltungseinheiten von AcpS sind grün, hell und dunkel blau dargestellt. (A) AcpS aus *B. subtilis* mit ACP (PDB-Code 1F80) (hier ist ACP rot dargestellt) (B) AcpS aus *Streptococcus pneumoniae* (PDB-Code 1FTH), hierbei ist das 3'-5'-ADP mitein.

In diesen drei Proteinen konnte ein β -Faltblatt(1)- α -Helix(3)- β -Faltblatt(2)-Motiv als Faltungseinheit beobachtet werden (siehe Abb. 6.2). In den AcpS sind drei monomere Faltungseinheiten über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft. Bei Sfp werden nur zwei monomere Einheiten (zwei Subdomänen) kovalent miteinander verknüpft.

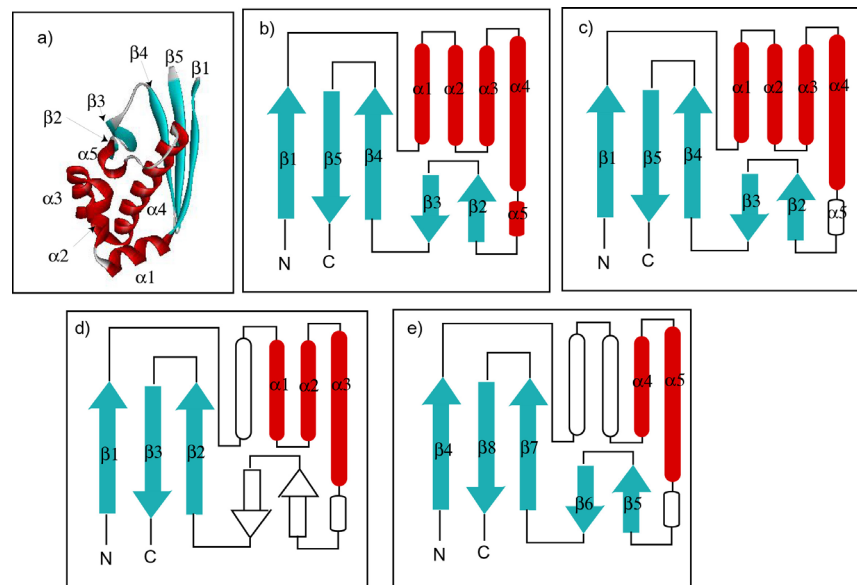


Abb. 6.2: Die Sekundärstruktur der monomeren Faltungseinheit der Superfamilie der 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen. Dargestellt sind: (a) Ribbon-Diagramm einer monomeren Einheit von *S. pneumoniae* AcpS; Topologie-Diagramme (nach Richardson) von (b) AcpS aus *S. pneumoniae*, (c) AcpS aus *B. subtilis*, (d) erste Hälfte (bzw. erste Subdomäne) von Sfp (1-103) und (e) zweite Hälfte (zweite Subdomäne) von Sfp (104-210). Die α -Helices sind rot, β -Faltblätter sind hell blau dargestellt. Die weißen Motive kennzeichnen Abweichungen der Faltungsmotive untereinander.

Die Sekundärstrukturen einer monomeren Faltungseinheit von Sfp und AcpS aus *S. pneumoniae* und *B. subtilis* sind sehr ähnlich. Der Vergleich von zwei der monomeren Faltungseinheiten aus der AcpS-Trimer (*B. subtilis*) mit der zwei Subdomänen von Sfp deuten darauf hin, dass die CoA-Bindungstasche in beiden Systemen übereinstimmt (siehe Abb. 6.3, 6.4 und 6.5). Die Positionen und Orientierungen von D8, E58, K62 und H105 in AcpS sind mit den Positionen D107, E151, K155 und H90 in Sfp komplementär. Chirgadze und Mitarbeiter stellten bei dem Vergleich von AcpS aus *S. pneumoniae* mit Sfp eine große Ähnlichkeit zwischen beiden Sekundärstrukturen fest (Chirgadze *et al.*, 2000).

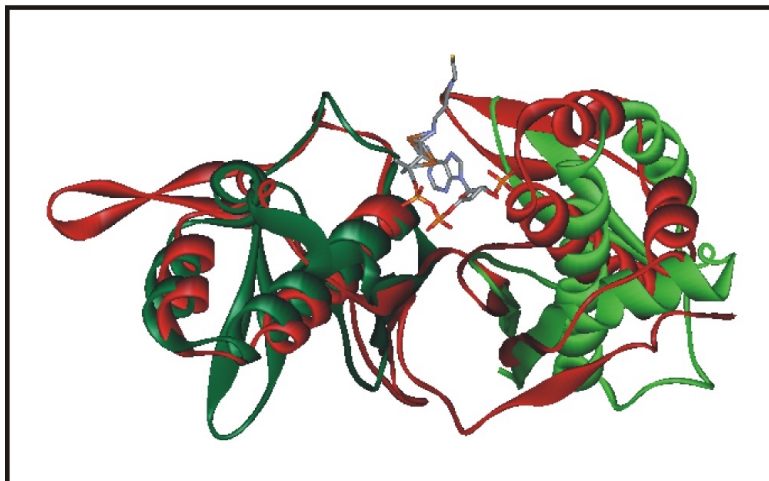


Abb. 6.3: Die Superpositionierung von AcpS (*B. subtilis*) mit Sfp. Sfp ist rot, AcpS grün dargestellt. Das CoA wurde als Stick-Modell eingezeichnet.

Sfp enthält nur ein aktives Zentrum für CoA und CP, während in AcpS jede Untereinheit ein aktives Zentrum besitzt. Wie in Kapitel 5.1.4.4 beschrieben wurde, versuchte ich durch die Konstruktion jeweils einer Hälfte von Sfp (H1: 1-103 und H2: 104-210) diese Organisation von AcpS nachzubauen und eine Trimerisierung der Sfp-Untereinheiten oder werden eine Dimerisierung zu erreichen. Es konnte jedoch weder eine Trimerisierung beobachtet noch konnten aktive Dimere erhalten werden.

6.1.4. Mutationsanalyse

Im Vorfeld der Kristallisation von Sfp wurden von Quadri und Mitarbeitern Mutationen in den Core-Motiven P2 und P3 eingeführt, um daraus Rückschlüsse auf die Funktionsweise von Sfp ziehen zu können (Quadri *et al.*, 1998c). Nach der Strukturaufklärung von Sfp und dem Vergleich mit weiteren PPTasen (AcpS mit ACP, AcpS mit CoA oder AcpS mit 3'-5'-ADP) wurde im Rahmen dieser Arbeit damit begonnen, systematisch Mutationen einzuführen und diese Mutanten auf ihren Einfluss hinsichtlich der posttranslationalen Modifikation der CP zu untersuchen. Durch die Analyse von Punktmutationen in Sfp konnte man Sfp in vier Bereiche unterteilen: (a) CoA-Bindungstasche, (b) PCP-Bindungstasche, (c) katalytische Tasche und (d) Homodimer-Interface.

6.1.4.1. CoA-Bindungstasche

CoA wird als Substrat von allen PPTasen akzeptiert. Die Core-Motive (P1, P2 und P3) sind dabei an der Bindung von CoA beteiligt (siehe Abb. 6.4). Hierbei wird das CoA in den Bindungstaschen der PPTasen in U-Form gebunden, im Unterschied zu anderen CoA-bindenden Enzymen, in denen es in gestreckter Form (Sandwich-Form) gebunden wird (Modis and Wierenga, 1998).

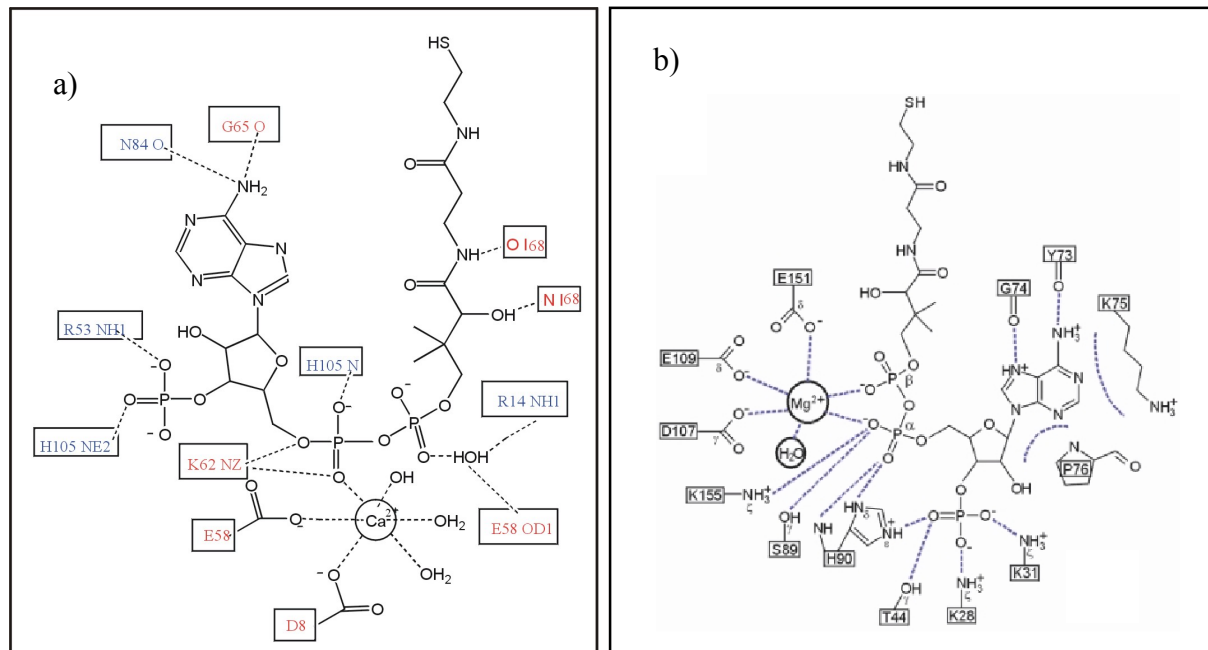


Abb. 6.4: CoA-Bindungstasche. (a) CoA wird in AcpS (*B. subtilis*) von zwei monomeren Einheiten koordiniert (Die Beschriftung in blau und rot verweisen auf die an der Bindung beteiligten Reste der verschiedenen Monomere), das Ca²⁺-Ion wird von E58 und D8 koordiniert. (b) CoA wird in Sfp von den beiden monomeren Einheiten koordiniert, beide Monomere sowie das Mg²⁺-Ion sind an der Bindung von CoA an Sfp beteiligt (Parris *et al.*, 2000; Reuter *et al.*, 1999).

Die Strukturdaten von Sfp zeigen, dass K28, K31, T44, K75, S89, H90, D107, E109, E151 und K155 an der Bindung von CoA beteiligt sind und dabei die Position H90 sowohl mit dem 3'-Phosphat als auch mit dem 5'-Phosphat des CoA koordiniert ist. Die Mutationsanalyse von H90 zeigt, dass die beiden Mutationen H90A oder H90N die Aktivität und katalytische Effizienz für PCP kaum verändern (mit 16,3 bzw. 19 min⁻¹μM⁻¹ für H90A bzw. H90N, 21,6 min⁻¹μM⁻¹ für Sfp), während die katalytische Effizienz für CoA sich halbiert hat (42 min⁻¹μM⁻¹ für H90A, bzw. 52,4 min⁻¹μM⁻¹ für H90N und 126,5 min⁻¹μM⁻¹ für Sfp). Interessanterweise wird das pH-Optimum in H90A von 6,0 bei Sfp auf einen breiten pH-Bereich ausgedehnt (7,5-9,0). Die BIAcore Untersuchungen zeigen, dass H90A den gleichen K_D-Wert wie Sfp in Bezug auf Protein-Protein-Interaktionen mit PCP (71 nM für H90A und 62 nM für Sfp) aufweist. Daraus lässt sich folgern, dass H90 an der Koordination von CoA beteiligt, aber nicht essentiell ist.

Die Mutation in K75N zeigt, dass sich die katalytische Effizienz für PCP kaum geändert hat, bei CoA dagegen von 126,5 min⁻¹μM⁻¹ bei Sfp auf 78,3 min⁻¹μM⁻¹ in der Mutante zurückging. Für die Punktmutante S89L wurden erhöhte K_M-Werte (für PCP: 17 fach, hPCP: 1,2 fach und CoA: 7 fach) gemessen (im Vergleich zu Sfp). Die entsprechenden k_{cat}-Werte liegen für PCP bei 50%, für hPCP bei 89% und für CoA bei 38% bezogen auf Sfp. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Rest sowohl an der CoA Bindung als auch an der CP-Bindung beteiligt

sind. Daraus kann gefolgert werden, dass die Mutation von Serin zu Leucin zu einer sterischen Hinderung der Sfp-CP Interaktion führt.

Die Mutationen in T44S, D107A*, D107E, E109D, E151A*, E151S, K155A und K155R führen alle zur Inaktivierung des Enzyms (die mit „*“ gekennzeichneten Mutation wurden von Quadri und Mitarbeitern durchgeführt (Quadri *et al.*, 1998c)). Überträgt man die Positionen dieser Reste in die Sfp-Struktur so erkennt man, dass alle diese Reste an der Bindung von CoA an Sfp beteiligt sind.

6.1.4.2. Die PCP-Bindungstasche

Das Carrier-Protein (CP) ist neben CoA das zweite Substrat der PPTasen und stellt aufgrund seiner strukturellen Vielfalt ein ungleich variables Substrat dar. Aus diesem Grund ergaben Sequenzvergleiche allein keine großen Informationen bezüglich der PCP-Bindungstasche. Erste Hinweise konnten erst durch den Vergleich der Kokristallstruktur von AcpS-ACP aus *B. subtilis* mit Sfp erhalten werden, da Sfp mit PCP nicht kokristallisiert wurde. Die Analyse des AcpS-ACP-Komplexes ergab die Existenz mehrerer Wasserstoffbrücken zwischen der α -Helix 1 von AcpS und der α -Helix 2 von ACP (Parris *et al.*, 2000). Durch den Vergleich der Monomereinheiten von AcpS aus *B. subtilis* mit der zweiten Hälfte von Sfp wird deutlich, dass die Region der α -Helix 1 von AcpS einer Schleife in Sfp entspricht. Die Reste K112, E117 und K120 des Sfp entsprechen dabei den Resten R14, Q22 und R24 in AcpS (siehe Abb. 6.5).

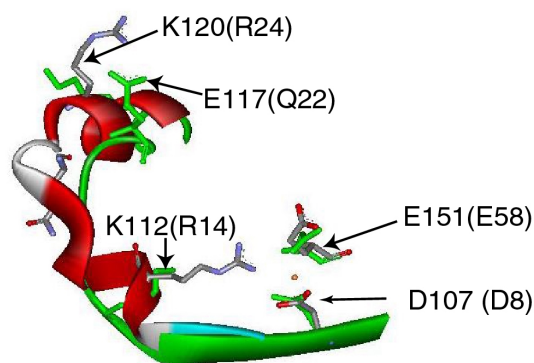


Abb. 6.5: Dargestellt ist die α -Helix 1 von AcpS (*B. subtilis*) (rot) und die entsprechende Region in Sfp (grün). D107, E151, K112, E117 und K120 sind Reste des Sfp. Die Reste D8, E58, R14, Q22 und R24 gehören zu AcpS. Das Mg^{2+} -Ion (orange) ist zwischen D107 und E151 lokalisiert.

Die Mutationsanalyse dieser drei Reste von Sfp ergab, dass, obwohl die drei Reste nicht an der Bindung von CoA beteiligt sind, eine Mutation von K112A, E117A und K120A die katalytische Effizienz für PCP ca. 65-fach und für CoA ca. 6-fach herabsetzt. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass die Bindung von PCP an Sfp ebenfalls über eine Interaktion zwischen Helix 2 und Sfp erfolgt. Im Diskussionsteil 6.2 wird dieser Vergleich anhand von Mutationen innerhalb des PCPs dargestellt und die Vermutung begründet.

Hiernach kann man ein Modell für die Sfp-PCP Interaktion, welches in Abb. 6.6 dargestellt ist, postulieren.

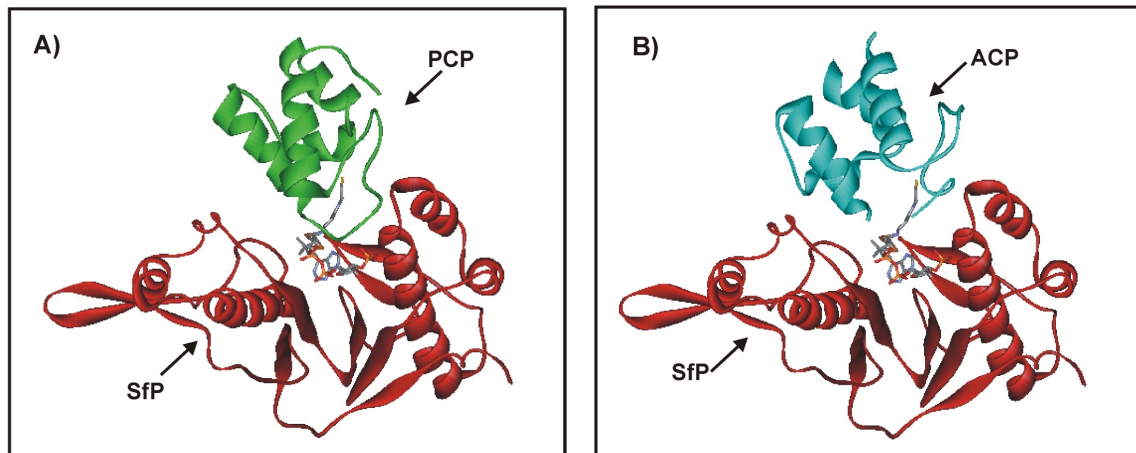


Abb. 6.6: Modell für die Sfp-PCP und Sfp-ACP Interaktion. Sfp ist rot, PCP grün und ACP blau dargestellt. In der Mitte von Sfp, ACP und PCP befindet sich CoA. Diese Superpositionierung wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt. Als Basis datei wurde der AcpS-ACP-Komplex (PDB-Code 1F80) verwendet.

Der Vergleich der CP-Bindungsregion von AcpS mit Sfp legt den Schluss nahe, dass die Natur sich zur Lösung der Spezifitätsfrage eines einfachen Hilfsmittels bediente. Für die CP des Primärkatabolismus findet man in der Binderegion des AcpS lediglich eine starre Helix; wohingegen in der Binderegion des Sfps eine flexible Schleife vorliegt. Dieser flexible Bereich erlaubte es Sfp sich an unterschiedliche Substrate anzupassen, AcpS nur an ACP.

6.1.4.3. Der Reaktionsmechanismus der Substraterkennung

Nach der Aufklärung der Sfp-CoA Kokristallstruktur wurde ein erster Reaktionsmechanismus für die Bindung von CoA an Sfp postuliert (Reuter *et al.*, 1999). Man nahm an, dass die Hydroxylgruppe des Serinrestes in Core T des PCPs durch das Mg^{2+} -Ion koordiniert wird (siehe Abb. 6.7). In einem nukleophilen Angriff greift das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe den Pyrophosphatrest von CoA am β -Phosphoratom an (Reaktion 1), wodurch 3'-5'-ADP freigesetzt wird (Reaktion 2).

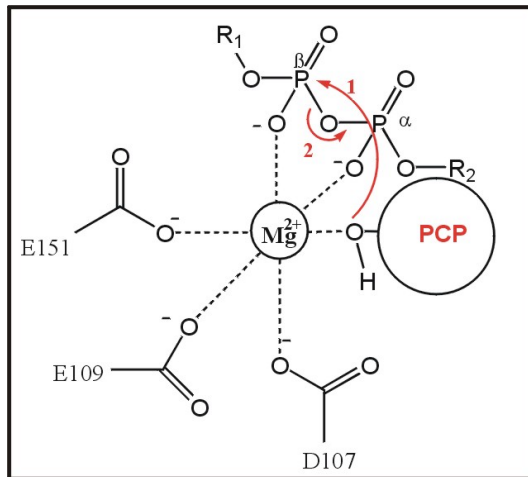


Abb. 6.7: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Bindung von CoA an Sfp. Das PCP wird mit seinem Serinrest anstelle von Wasser am Mg^{2+} -Ion koordiniert und von diesem deprotoniert. Anschließend greift das PCP das β -Phosphat des Pyrophosphat von CoA an, dabei wird 3'-5'-ADP abgespalten (Reuter *et al.*, 1999).

Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse in dieser Arbeit widerlegt werden. Durch die Mutationsanalyse und den Strukturvergleich mit AcpS-ACP und AcpS-CoA liegt die Vermutung nahe, dass der Serinrest des PCP von der gegenüberliegenden Seite des am Mg^{2+} -Ion koordinierten Wassermoleküls angreift (siehe Abb. 6.8). Hinzu kommt, dass der Abstand für den nukleophilen Angriff für das α -Phosphoratom geringer ist als das mit über 5Å entfernte β -Phosphoratom und damit begünstigt als nukleophiler Angriffspunkt dienen kann.

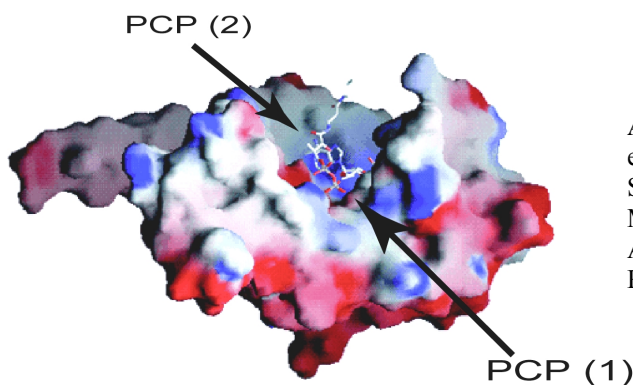


Abb. 6.8: Das Interface von PCP und Sfp. In den ersten Modellen wurde vermutet, dass das PCP von Seite (1) an Sfp andockt (Reuter *et al.*, 1999). Durch Mutationsanalyse und Strukturvergleiche mit AcpS-ACP wird der Angriff von der gegenüberliegenden Richtung Seite (2) favorisiert.

Eine zweite Hypothese wurde von Parris und Mitarbeitern entwickelt und wird als „Hydroxid-Anion-Wanderung“ bezeichnet (Parris *et al.*, 2000). Hierbei wird angenommen (siehe Abb. 6.9), dass das am Metallion (hier Ca^{2+} -Ion) koordinierte Wassermolekül von diesem deprotoniert wird (Reaktion 1). Dieses wiederum deprotoniert ein benachbartes Wassermolekül (Reaktion 2), welches seinerseits den Serinrest des ACP deprotoniert. Der Sauerstoff des Serinrestes greift nun nukleophil CoA an dessen β -Phosphoratom an (Reaktion 3), worauf durch anschließende Elektronenwanderung 3'-5'-ADP freigesetzt wird (Reaktion 4).

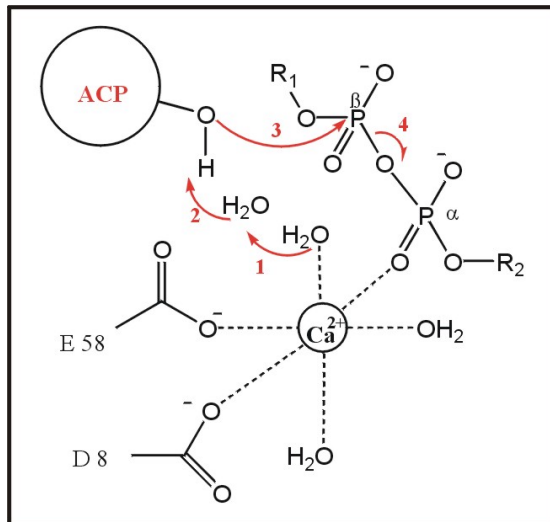


Abb. 6.9: Die Hypothese “Hydroxid-Anion-Wanderung” nach Parris und Mitarbeitern. Das am Metall-Ion koordinierte Wassermolekül (1) wird deprotoniert und deprotoniert seinerseits ein weiteres Wassermolekül (2). Der Serinrest des ACPs wird dann anschließend deprotoniert (3) und greift nukleophil das β -Phosphoratom des Pyrophosphats des CoAs an, wobei 3'-5'-ADP abgespalten wird (4) (Parris *et al.*, 2000).

Die Hypothese der “Hydroxid-Anion-Wanderung” erscheint nicht plausibel, da die beiden gebildeten Hydroxid-Anionen jedes für sich in der Lage sind das Pyrophosphat des CoA anzugreifen und dabei 3'-5'-ADP abzuspalten, was sich durch die einsetzende Hydrolyse von CoA in Abwesenheit von ACP zeigt. Weiterhin wurde in Sfp-CoA (Reuter *et al.*, 1999) und AcpS-CoA Kokristallen kein hydrolysiertes CoA beobachtet. *In vitro* Versuche unter Verwendung von Ca^{2+} -Ionen anstelle der üblichen Mg^{2+} -Ionen ergaben für Sfp und AcpS keine posttranslationale Modifikation der CP (siehe 5.1.3.3 und Abb. 5.10). Wobei es sich vermutlich bei AcpS-CoA-Komplex mit Ca^{2+} -Ion um einen Artefakt handelt.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass im Sfp-CoA Kokristall an der Position des dargestellten Wassers (1) im natürlichen System ein Pyrophosphat lokalisiert ist (siehe Abb. 6.4 und 6.7) (Reuter *et al.*, 1999). Die artifizielle Struktur im Kristall erlaubt allein somit nicht die Begründung, die Parris und Mitarbeiter für ihren Reaktionsmechanismus postuliert haben. Eine dritte Hypothese wurde aus dem Vergleich der Kokristallstrukturdaten von Sfp-CoA, AcpS-ACP und AcpS-CoA abgeleitet. Man nimmt dabei an, dass es sich bei der Reaktion um einen basenkatalysierten Reaktionsmechanismus handelt. Als Base dient der hochkonservierte Rest E151 in Form des Carboxylats. Die Kokristallstrukturdaten von AcpS-CoA weisen darauf hin, dass die Reste D8 deprotoniert und K62 protoniert vorliegen (Parris *et al.*, 2000).

In meiner Modellvorstellung sind die drei negativ geladenen Sfp-Reste, das Pyrophosphat des CoA und ein Wassermolekül am Mg^{2+} -Ion koordiniert (siehe Abb. 6.10). Der Serinrest des PCP ist zwischen der Carboxyl-Gruppe und dem β -Phosphat lokalisiert, während E151 die Hydroxyl-Gruppe des PCP deprotoniert (Reaktion 1), welche nukleophil das β -Phosphoratom in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion angreift (Reaktion 2) und dadurch 3'-5'-ADP freisetzt (Reaktion 3). Das Proton der Carboxylat-Gruppe wird auf Rest D107 übertragen (Reaktion 4) und von dort weiter auf Rest K155 (Reaktion 5), ehe es am Sauerstoff des α -Pyrophosphats gebunden wird

(Reaktion 6). Alle diese Reste liegen in den Sfp- und AcpS-Kokristallen in einem für Wasserstoffbrücken üblichen Abstand zueinander.

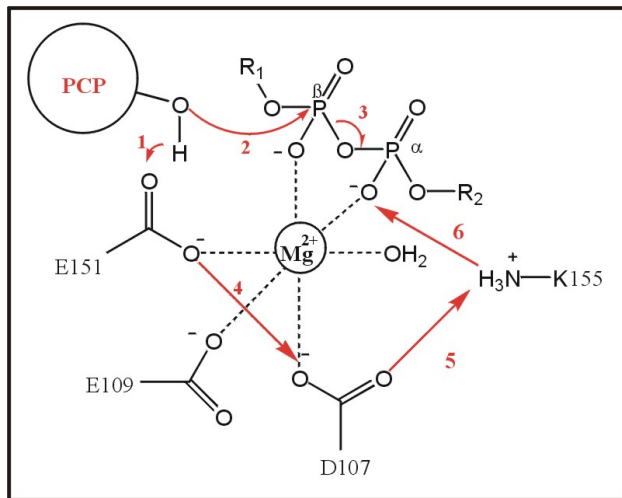


Abb. 6.10: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Übertragung des 4'-Pant auf PCP nach Mofid. Die Carboxylat-Form von E151 dient als Base und deprotoniert den Serinrest, dessen nukleophiler Sauerstoff CoA am β -Phosphatatom des CoA angreift und 3'-5'-ADP abspaltet.

Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wurde auch für die zinkabhängige β -Lactamase aus *B. cereus* (Fabiane *et al.*, 1998) und die MutT Pyrophosphohydrolase (Lin *et al.*, 1997) beobachtet. Bei der zinkabhängigen β -Lactamase wird der Rest D90 an ein Zn^{2+} -Ion koordiniert und deprotoniert ein Wassermolekül. Das so gebildete Hydroxyl-Anion greift dann nukleophil den β -Lactamring des Penicillins an.

Die Mutationsanalyse der hochkonservierten Reste E151Q und D107N untermauert diese Hypothese, da durch diese Mutation der nukleophile Sauerstoffs von E151 zu Stickstoff die Nukleophilie und die Basizität von E151 vermindert wird und daraus resultierend die katalytische Effizienz um fast das 1000 fache abnimmt. Gleiche Resultate erhält man für die zweite Mutation D107N (für PCP: D107N: $0,06 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ und für CoA: $0,3 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$). Dieser Sachverhalt lässt sich durch die Rolle von Rest D107 als Protonenüberträger von E151 zu K155 und anschließend auf den Sauerstoff des α -Pyrophosphats erklären.

6.2. Konstruktion eines universellen Peptidyl-Carrier-Proteins

Im vorangegangenen Kapitel wurde darauf hingewiesen, dass PCP von AcpS nicht modifiziert werden kann. Daher schien es ein lohnendes Ziel zu sein, durch die Einführung von Punktmutationen oder durch Austausch des ganzen putativen Interaktionsbereiches im PCP, eine Erkennung von AcpS durch PCP zu erreichen. In dieser Arbeit entschloss ich mich für die zweite Variante. Nach den erfolgreichen Untersuchungen an PCP und Sfp Mutanten sollten hier durch Punktmutationen die wichtigen Reste für die Protein-Protein-Erkennung zwischen PCP und AcpS näher zu bestimmen.

6.2.1. Erkennung von universellen PCPs durch AcpS und Sfp

Ein Austausch von 14 Aminosäuren in Helix 2 des TycC3-PCP und 12 Aminosäuren in TycA (A-PCP-E) mit den entsprechenden Regionen des ACP ergab die neuen Hybridproteine, hPCP und hTycA, die sowohl von AcpS (*B. subtilis*) als auch von Sfp erkannt wurden. Während der heterologen Expression in *E. coli* wurden die Proteine hPCP und hTycA *in vivo* zu 51% bzw 75% modifiziert, die Ausgangskonstrukte unter gleichen Bedingungen nur zu 7% bzw 5%. Die biochemische Charakterisierung für hPCP im Vergleich zu PCP zeigte, dass sich der k_{cat} -Wert für Sfp mit 96 min^{-1} nicht geändert hat, wohl aber der K_M -Wert von $4,45 \mu\text{M}$ auf $26 \mu\text{M}$ anstieg und damit immer noch niedriger war, als der K_M -Wert für ACP mit $38 \mu\text{M}$. Nun wurde versucht durch Einführung von Punktmutationen in der ausgetauschten Helix des PCPs die Interaktion mit AcpS bzw. Sfp näher zu untersuchen. Im Fokus standen dabei fünf Aminosäurereste H44, K47, A50, H56 und R57 in der Helix 2 in PCP. Diese Reste entsprechen den sauren Resten D35, D38, E41, E47 und D48 in ACP (siehe Abb. 2.9). Anhand ihrer Lokalisierung auf der Helix 2 wurden die Reste einem N-terminalen (mit H44D, K47D und A50E) und C-terminalen (mit H56E und R57D) Bereich zugeordnet (siehe Abb. 5.29). Das Konstrukt mit den Mutationen im N-terminalen Bereich wurde als V1, mit Mutationen im C-terminalen Bereich als V2 bezeichnet. V3 stellt die Mutante dar, in der alle 5 Positionen ausgetauscht wurden. V1 und V3 wurden *in vivo* zu 12% bzw 70% modifiziert, während die Ausgangskonstrukte nur zu 1% modifiziert wurden. Es zeigte sich, dass mit steigender Zahl der Mutationen in Helix 2 auch die katalytische Effizienz für AcpS ansteigt und bei Sfp sinkt. Dieses kann als eine Anpassungstrend zur jeweiligen PPTase interpretiert werden. Da die Mutante V2 mit H56E und R57D nur von Sfp modifiziert wurde, können diese Reste als nicht essentiell für die AcpS-Erkennung definiert werden.

Sequenzvergleiche in der Acyl-Carrier-Protein Superfamilie zeigen (siehe Abb. 2.9), dass die Reste H44 und A50 nicht konserviert sind. In PCP^E findet sich Aspartat anstelle des Histidins an Position 44 in PCP^C, weshalb PCP^E nicht von AcpS modifiziert werden kann. Dagegen PCP^C und PCP^E findet man in Position K47 fast immer einen positiv geladenen Rest wie Lysin oder Arginin, seltener polare Reste wie Glutamin oder Asparagin. Es wurden zwei Punktmutationen K47A und K47D in das PCP von TycC3-PCP bzw. ProCAT eingeführt. Die Mutationsanalyse zeigte, dass beide Mutanten K47A und K47D von AcpS und Sfp *in vitro* modifiziert werden. Während der heterologen Expression in *E. coli* wurden die Mutanten PCP K47D, PCP K47A, ProCAT K47D und ProCAT K47A *in vivo* bereits teilweise modifiziert, wobei der Modifikationsgrad deutlich über dem der Ausgangskonstrukte lag. Aus Strukturdaten des AcpS-ACP-Komplexes kann die Wechselwirkung von R14 von AcpS mit

D38 von ACP abgeleitet werden (Abb. 6.12b). Ein Vergleich mit den Strukturdaten der Sfp- und AcpS-Kristallstrukturen machte mich auf die benachbarten Reste der Aminosäure K44 von AcpS *B. subtilis* und D40 von Sfp aufmerksam. Anhand der Punktmutationen in PCP und Sfp und der Übertragung der Sekundärstruktur von PCP aus dem AcpS-ACP-Komplex auf die Sfp-Struktur kann man für die Wechselseitige Spezifität der CPs mit Sfp bzw. AcpS eine Bindungsstelle postulieren (siehe Abb. 6.11).

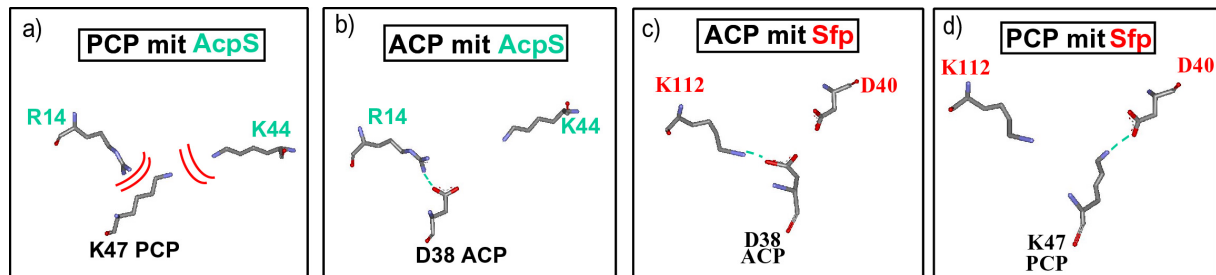


Abb. 6.11: Postulierte spezifitätsvermittelnde Bindungsstelle von PCP-Sfp und ACP-AcpS. Die Reste aus PCP und ACP sind schwarz, AcpS grün und Sfp rot markiert. (a) und (b) zeigen die AcpS-Erkennungstasche mit R14 und K44, (c) und (d) zeigen die Sfp-Erkennungstasche mit K112 und D40. AcpS kann nur ACP erkennen, da Rest K47 des PCP die Reste von AcpS abstößt [Die Abstoßung: $\text{--}\text{--}\text{--}$]; Sfp kann sowohl über K112 als auch über D40 Wasserstoffbrücken mit D38 von ACP bzw. K47 von PCP ausbilden.

Aus Abb. 6.11 geht hervor, dass die beiden positiven Reste R14 und K44 der AcpS-Erkennungstasche den positiv geladenen Rest K47 des PCP abstoßen, dagegen aber mit dem Rest D38 des ACP eine geeignete Tasche ausbilden können (Parris *et al.*, 2000). Bei Sfp bilden die entsprechenden Reste K112 und D40 die Erkennungstasche sowohl mit dem positiv geladenen Rest K47 von PCP, als auch mit dem negativ geladenen Rest D38 von ACP. Bei der Mutation von D40K wurde die katalytische Effizienz für PCP um das 30-fache gesenkt, ebenfalls bei der Mutation von K112A für hPCP.

In der Kokristallstruktur von AcpS-ACP ist die Position K44 zu Alanin mutiert. Der Vergleich dieses Restes mit der entsprechenden Region in Sfp und AcpS von *S. pneumoniae* ergab (durch Superpositionierung der Strukturen und Analyse in Programm O (Jones *et al.*, 1991)), dass dieser Rest bei Sfp D40 und bei AcpS von *S. pneumoniae* R47 entspricht. Alle diese Reste sind am Anfang der großen α -Helix 4 in AcpS bzw. 3 in Sfp lokalisiert.

6.2.2. Strukturmodell eines universellen Peptidyl-Carrier-Proteins

Strukturanalysen in der ACP-Superfamilie ergaben für diese Enzymklasse das charakteristische Motiv eines über Schleifen verbundenen vier-Helix-Bündels. Die kürzlich gelöste NMR-Struktur von ACP aus *Mycobacterium tuberculosis* (Wong *et al.*, 2002) bestätigt dies eindrucksvoll und macht die große Homologie der CP auf Sekundärebene deutlich. Die Hauptunterschiede zwischen den CP findet man bei der Oberflächenladung. So

beträgt z.B. für ACP der FAS (*B. subtilis*) der pI-Wert 3,8, für PCP der Tyrocidin-Synthetase TycC3 (*B. brevis*) 7,6 und für das hPCP (Hybrid-PCP) 4,9 (Abb. 6.12). Aus der Strukturanalyse wird deutlich, dass die Helix 2 auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist. Dies konnte für hPCP durch CD-Spektroskopie und Vergleich mit ACP und PCP bestätigt werden. Das Strukturmodell für hPCP wurde mit dem Programm SWISS-PROT erstellt (Guex and Peitsch, 1997), wobei PCP als Leitstruktur diente.

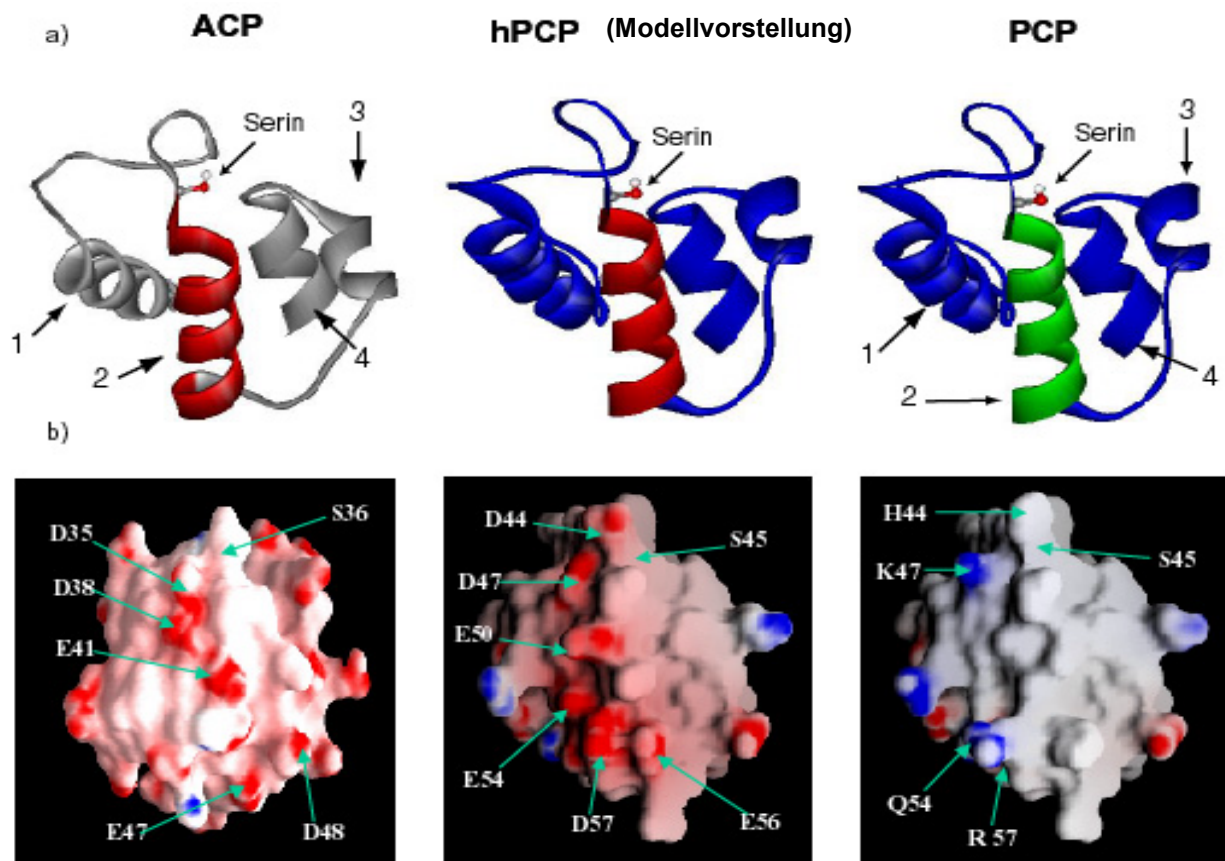


Abb. 6.12: Sekundärstruktur und elektrostatisches Oberflächenpotential von ACP, hPCP und PCP. (a) Die Ribbon-Diagramme von ACP (Links), hPCP (Mitte) und PCP (Rechts) sind in der gleichen Orientierung dargestellt; der invariante Serinrest ist markiert. Das hPCP setzt sich aus Helix 2 (rot) aus ACP und dem übrigen Bereich (blau) des PCP zusammen. In Abbildung a sind die Helices mit den Zahlen 1, 2, 3 und 4 markiert. (b) Elektrostatisches Oberflächenpotential: Saure Reste sind in rot, neutrale, in weiß, basische Reste in blau dargestellt (GRASP, Nicholls *et al.*, 1991).

6.2.3. Die Protein-Protein-Erkennung in CPs und PPTasen

Frühere Arbeiten favorisierten die trimere Organisation von AcpS als entscheidendes Kriterium für die Protein-Protein-Erkennung zwischen der PPTase und dem CP.

In neueren Untersuchungen konnte jedoch eine PPTase des Sfp-Typs NysF aus *Streptomyces noursei* ATCC 11455 gefunden werden, die im PKS-Kluster der Nystatin-Synthase die ACP modifiziert (Brautaset *et al.*, 2000). Dadurch kann die Trimerisierung nicht das entscheidende Kriterium für die Protein-Protein-Erkennung sein.

Die erhaltenen Ergebnisse aus dem Helix-Austausch in hTycA und den Punktmutationen in ProCAT sowie dem dimodularen System ProCAT-LeuCAT-Te zeigten, dass diese durch AcpS modifiziert werden können. Dies zeigt eindeutig, dass die Quartärstruktur nicht für die Erkennung verantwortlich ist, sondern einzig Helix 2. Der Quartärstruktur kann damit lediglich eine Hinderung bzw. Förderung der Interaktion zugeschrieben werden.

Ein weiterer Faktor der Protein-Protein-Erkennung ist das unterschiedliche Oberflächenpotential von ACP und PCP. Die katalytische Effizienz der ACP-Modifikationen von ACP aus FAS *E. coli* und der ACP der PKS für Frenelin, Granaticin, Oxytetracyclin und Tetracenomycin aus *Streptomyces spp.* sind mit AcpS aus *E. coli* untersucht worden (Gehring *et al.*, 1997). Dabei zeigte sich, dass die katalytische Effizienz für ACP bei AcpS aus *E. coli* (pI-Wert 9,25) zunahm, je saurer das jeweilige ACP war. Die gleiche Tendenz konnte durch den Vergleich der Ergebnisse aus den Arbeiten von Quadri (Quadri *et al.*, 1998c) und Gehring (Gehring *et al.*, 1998b) auch für AcpS aus *B. subtilis* beobachtet werden. Die Untersuchungen an Sfp zeigten im Vergleich dazu, dass je genauer der pI-Wert des CPs mit dem pI 6,33 von Sfp übereinstimmte, desto besser war es als Substrat für Sfp geeignet. In Tabelle 6.1 und Abb. 6.13 sind die Werte dieser Berechnungen aufgeführt.

Tabelle 6.1: Korrelation der isoelektrischen Ladung der CP mit der Erkennung durch Sfp.

CP	pI-Wert	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
TycC3-PCP	7,3	21,57
SrfB1-PCP	6,5	80
SrfB2-PCP	6,3	31
Lys2-PCP	6,14	14
EntB-ArCP	6,02	4
PCPK47A	7,10	25,8
PCPK47D	6,77	15,9
HPCP	4,9	3,7
ACP FAS <i>E.coli</i>	3,9	1
ACP FAS <i>B. subtilis</i>	3,8	0,3

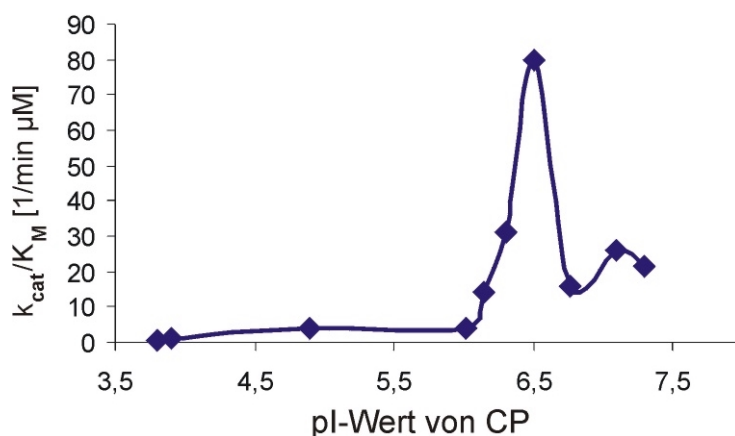


Abb. 6.13: Korrelationsdiagramm der isoelektrischen Ladung der CP mit der katalytischen Effizienz von Sfp.

Schließlich konnte durch die Verkürzungsmutante von TycC3-PCP gezeigt werden, dass die N-terminale Deletion von 8 AS die Aktivität nicht beeinträchtigt; TycC3-PCP stellte immer noch ein intaktes PCP dar, das von Sfp erkannt und modifiziert wurde. In einem weiteren Experiment konnten Quadri und Mitarbeiter zeigen, dass ein 19 AS langes Peptid (im Bereich des Core T) nicht von Sfp erkannt und modifiziert wird. Alle gegenwärtigen Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Sequenz von Core T alleine nicht für eine erfolgreiche Interaktion und damit Modifikation ausreichend ist, sondern eher die strukturelle Art des CP ausschlaggebend für eine erfolgreiche Modifikation ist.

6.2.4. Protein-Protein Interaktion universeller PCP mit Domänen und Modulen

Im Zuge der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde auch die Protein-Protein Interaktion nicht nur mit der PPTase untersucht, sondern es sollte ebenfalls die Kommunikation mit den anderen Domäne der NRPS untersucht werden. Dabei wurden die Domänen im einzelnen betrachtet und die Module als ganzes um ein umfassendes Bild der Arbeitsweise und der Proteinerkennung zu erhalten.

6.2.4.1. Kommunikation zwischen A-Domäne und PCP

Mit Hilfe des radioaktiven Beladungsassays wurde die Kommunikation der A-Domäne und hPCP in hTycA bzw. der A-Domäne mit dem mutierten PCP-K47A, PCP-K47D, PCPV1 und PCPV3 in ProCAT untersucht. In allen Fällen konnte die radioaktiv markierte Substrataminosäure zu 100% als Thioester gebunden werden, was für eine funktionierende Kommunikation spricht. Neuere Untersuchungen von Marshall und Mitarbeitern zeigten, dass A-Domänen trotz hoher Substratspezifität in ihrer Protein-Protein Interaktion mit den PCP eine Toleranz aufweisen (Marshall *et al.*, 2002a). Eine gezielte Veränderung der PCP führte jedoch in diesen Fällen zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der Affinität der beiden Proteine zueinander.

6.2.4.2. Kommunikation zwischen PCP und C-Domäne

Auch die Kommunikation zwischen PCP- und C-Domäne wurde durch die Mutationen in ProCAT nicht deutlich beeinflusst. Wie der DKP-Bildungsassay zeigte, konnten alle fünf ProCAT Mutanten V1, V2, V3, K47A und K47D mit TycA das Produkt D-Phe-L-Pro-DKP bilden (siehe Abb. 5.29). Die Untersuchungen zur Selektivität der C-Domäne zeigten ähnlich

der A-Domäne eine deutliche Selektivität für die kognate Aminosäure. Die Mutationen in der Helix 2 des PCPs zeigten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Protein-Protein Interaktion zwischen PCP und C-Domäne, was durch die Experimente mit TycA und ProCAT-LeuCAT-Te gezeigt werden konnte. Aktuelle Untersuchungen von Marshall und Mitarbeitern zeigen, dass zwei Reste des PCPs, D36 und A53 an der Interaktion mit der C-Domäne beteiligt sind (Marshall *et al.*, 2002a). Untersuchungen dieser Reste wurden jedoch bisher noch nicht im PCP von ProCAT durchgeführt.

6.2.4.3. Kommunikation zwischen PCP und E-Domäne

Im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen zur A- und C-Domäne zeigte sich bei der Kommunikation zwischen dem PCP und der E-Domäne offensichtlich eine Unterbrechung der Interaktion der beiden Proteine. In den Experimenten mit PCP und E-Domäne in hTycA konnte keine Racemisierung von L-Phe-S-Ppant-PCP zu D-Phe-S-Ppant-PCP beobachtet werden, obwohl Sequenzierungsexperimente für die E-Domäne keine Punktmutationen ergaben. Nur durch Zugabe von D-Phe als Substrataminosäure für hTycA konnte das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP mit einer Ausbeute von 25% des Wildtyps gebildet werden. In den Untersuchungen von hTycA mit den ProCAT Mutanten V1, V2 und V3 erhielt man ähnliche Ausbeuten (27%, 23% und 22% bezogen auf die Ausgangskonstrukte). Aus diesen Daten folgt der Schluss, dass nicht die Kommunikation zwischen hPCP und der C-Domäne von ProCAT gestört ist, sondern, wie angesprochen, die Kommunikation zwischen hPCP und der E-Domäne in hTycA unterbrochen ist. Analoge Ergebnisse erhielt man, wenn man ProCAT-LeuCAT-Te als Partner für hTycA einsetzte.

Untersuchungen zur Substratspezifität von E-Domänen (Belshaw *et al.*, 1999; Linne and Marahiel, 2000; Luo and Walsh, 2001) zeigen, dass die E-Domäne in bezug auf die Substrataminosäure sehr restriktiv ist und diese nur mit sehr geringer katalytischer Effizienz racemisieren kann. Linne und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die E-Domäne in bezug auf das Carrier-Protein eine klare Selektivität zeigt, woraufhin PCP^E und PCP^C biochemisch charakterisiert wurden (Linne *et al.*, 2001). Frühere Untersuchungen von GrsA(A-PCPΔE) mit ProCAT zeigten, dass die beiden Enzyme nicht in der Lage sind, das Produkt D-Phe-L-Pro-DKP herzustellen (Stachelhaus *et al.*, 1998). Aus diesem Ergebnis kann man ableiten, dass eine korrekt gefaltete E-Domäne essentiell für die Protein-Protein-Erkennung mit der C-Domäne von ProCAT ist.

6.2.4.4. Posttranslationale Modifikation von hPCP in NRPS

Wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben, wurden die hTycA- und ProCAT-Mutanten K47A, K47D, V1 und V3 sowie das Dimodul ProCAT-LeuCAT-Te von AcpS und Sfp modifiziert. Durch Inkubation von hTycA mit ProCATV3-LeuCAT-Te (beinhaltet universelles PCP), den Aminosäuren (D-Phe, L-Pro und L-Leu) und ATP *in vitro* mit AcpS konnte nur das Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP gebildet werden. Gab man anstelle von AcpS Sfp in den Reaktionsansatz, so konnte die Bildung des Tripeptids D-Phe-L-Pro-L-Leu nachgewiesen werden. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch Verwendung des universellen Peptidyl-Carrier-Proteins die Bildung eines Produktes durch den gezielten Einsatz einer PPTase gesteuert werden kann. Unter anderem kann man durch den Einsatz von universellen Peptidyl-Carrier-Proteinen in NRPS auf die *in vitro* Modifikation mit der PPTase von Sfp-Typ verzichten, da die Modifikation *in vivo* stattfindet.

6.2.5. Protein-Protein Interaktion von CP mit Domänen und Modulen von NRPS, PKS und FAS

Carrier-Proteine haben in NRPS, PKS und FAS stets die gleiche Funktion, den Transport von aktivierten Substraten zu anderen katalytischen Zentren innerhalb des Multienzymkomplexes sicherzustellen. Die Strukturstudien zeigen, dass es keine umfassenden strukturellen Unterschiede für CP zwischen ihrer apo- und holo-Form gibt. Der an den invarianten Serinrest gebundene 4'-Ppant kann zwei Positionen einnehmen: 1) gebunden in einer hydrophoben Furche an der Oberfläche des CP oder 2) frei in Lösung. Diese zwei Positionen konnten anhand von Strukturdaten bestimmt werden (Wong *et al.*, 2002).

Eine weitere Analogie innerhalb der CP ist die Variabilität des flexiblen Bereiches in der zweiten Schleifenhälfte zwischen α -Helix 1 und 2 (Weber *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001). Diese Flexibilität verleiht dem CP eine dynamische Oberfläche im Bereich des reaktiven Serinrestes, wodurch das CP sich auf seinen jeweiligen Interaktionspartner einstellen kann.

Bis jetzt existiert keine Kokristallstruktur einer NRPS-Domäne mit einer PCP-Domäne. Bei der kürzlich gelösten Kristallstruktur der Te-Domäne der Surfactin-Synthetase (*B. subtilis*) konnten jedoch Anhaltspunkte für die PCP-Bindungsregion gewonnen werden (siehe Abb. 6.14 a und b). Als Hinweise für diese Position kann die Koordination eines Sulfations am Eingang des Solventkanals gewertet werden, dass das Phosphat-Ion des 4'-Ppant im natürlichen System repräsentiert. Diese PCP-Binderegion besteht aus hydrophoben

Aminosäuren, die in der Te-Domäne lokalisiert und in fast allen Te-Domänen konserviert sind (Bruner *et al.*, 2002).

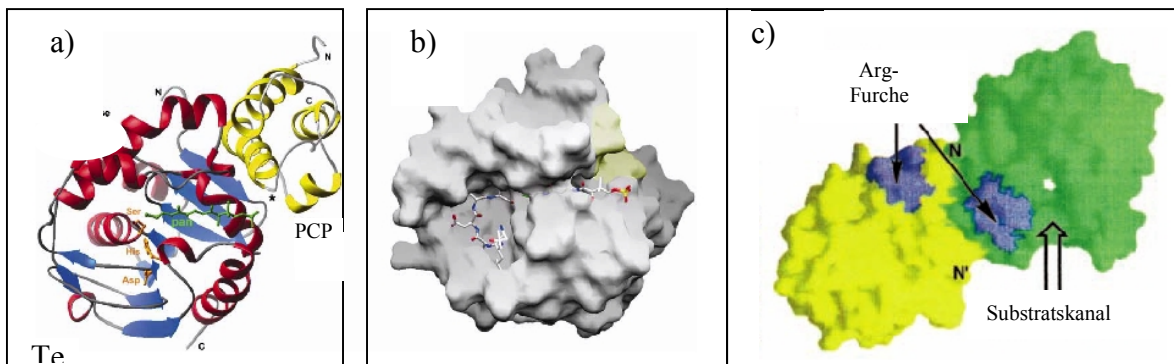


Abb. 6.14: Postulierte Interaktion von CP mit nativen Proteinp Partnern. Dargestellt sind (a) Ribbon-Diagramm der Srf-Te (rot und blau) mit TycC3-PCP (gelb) und 4'-Ppant (grün), (b) Oberfläche der Srf-Te mit eingebautem Produkt-Precursor und (c) dimere Struktur der Te-Domäne von DEBS6. Die Monomere sind gelb und grün dargestellt. Die Arginin-Furche auf der Oberfläche der Te-Domäne ist blau markiert (Bruner *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2001).

An der Oberfläche der dimeren Te-Domäne wurde jeweils eine positiv geladene Furche, die aus je fünf konservierten Argininresten besteht, beobachtet (siehe Abb. 6.13). Diese Furche wurde als ACP-Bindungsregion vorgeschlagen (Tsai *et al.*, 2001). Diese Modellvorstellung wurde mit Hilfe des Computerprogramms FTDOCK als wahrscheinlichste Interaktionsregion errechnet (Jackson *et al.*, 1998).

Nach dem gleichen Prinzip wurde die negativ geladene ACP-Struktur an die Kristallstruktur der β -Ketoacyl-ACP Synthase III (FabH) der FAS andockt (Zhang *et al.*, 2001). Auf der Oberfläche von FabH findet sich in der Nähe des Reaktionszentrums ein positiver Bereich aus konservierten Arginin- und drei weiteren Lysinresten. Die BIAcore Analyse von R249A (Mutante in diesem Bereich) zeigte, dass die FabH Mutante nicht mehr mit ACP interagieren kann. Daraus wird geschlossen, dass die CP-Bindungsregion je nach Interaktionspartner an der Oberfläche verschiedene Erkennungskriterien, wie Ladung und Hydrophobizität verwendet, die zur Bindung führen, wie bei der putativen PCP-Bindungsstelle von Sfp oder der ACP-Bindungsstelle von AcpS.

6.3. Ausblick

6.3.1 PPTasen:

Die PPTasen gehören häufig zu den essentiellen Enzymen in Mikroorganismen. Die vielfältigen Erkennungsmöglichkeiten für die CP-Substrate wird durch die dreidimensionale

Struktur diese Enzyme bestimmt. Durch die Kokristallisation zwischen verschiedenen PPTasen und den jeweiligen CPs und die Mutationsanalyse in PPTasen konnte die CP-Erkennungsregion für weitere PPTasen aufgeklärt werden. Die Aufklärung des CP-PPTasen-Interfaces stellt eine essentielle Grundlage zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten mit der PPTase als Zielprotein dar. Durch ein detailliertes Wissen sowohl der dreidimensionalen Struktur als auch der Wechselwirkungen und des Reaktionsmechanismus können Inhibitoren gezielt entwickelt und neue Medikamente mit hohem Therapieindex entwickelt werden (Chirgadze *et al.*, 2000; Flickinger and Perlman, 1979; Parris *et al.*, 2000). Untersuchungen an AcpS-Deletionsmutanten von Mootz zeigten eindeutig, dass Mikroorganismen wie *E. coli* oder *B. subtilis* ohne eine PPTase nicht in der Lage sind zu wachsen (Mootz, 1999). Zusammen mit der Arbeit von Parris und Mitarbeitern stellen diese Untersuchungen eine erste Grundlage für das Verständnis der Substraterkennung der PPTasen des Sfp- und AcpS-Typs in den Mikroorganismen dar.

6.3.2. Neue Erkenntnisse durch Strukturaufklärung verschiedener NRPS-Domänen

Das PCP gehört zu den essentiellen Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen. Daher stellt die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion zwischen PCP und verschiedenen NRPS Domänen einen wichtigen Aspekt für das Verständnis der Kommunikation zwischen NRPS-Domänen bzw. Modulen dar. Bis jetzt existieren darüber keine strukturellen Informationen. Mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen in den letzten Jahren wurde versucht Erkenntnisse über die Kommunikation zwischen Domänen und Modulen zu sammeln. Die NMR-Untersuchungen stellen hierbei eine attraktive Möglichkeit dar, da sie die direkte Messung der Interaktionen zwischen Proteinen ermöglichen. Es ist möglich, durch Signalverschiebungen von $^{15}\text{-N}$ markierten PCP mit anderen NRPS-Domänen (z.B. A-, C-, E-Domäne oder TEII) auf die Interaktion von PCP-Resten mit den NRPS-Domänen zu schließen. Dadurch können die Reste des PCP, die für Protein-Protein-Interaktion mit verschiedenen NRPS-Domänen wichtig sind, bestimmt werden. Die atomare Aufklärung dieser Protein-Protein Interaktionen mittels der NMR-Methode kann als komplementär zu bisherigen biochemischen Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion betrachtet werden. Die Strukturaufklärung von Srf-TEII und der Kristalle der TycB3-E-Domäne stellen einen ersten Ansatz zum besseren Verständnis der Interaktionen dar und zeigen neue Möglichkeiten

zu einem rationellen Design von Inhibitoren oder Synthetase-komplexen zur Synthese von neuartige Peptidantibiotika auf.

7. Literatur

- Aharonowitz, Y., Cohen, G. and Martin, J.F. (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, **46**, 461-95.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 488-94.
- Baldwin, T.O. (1996) Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure*, **4**, 223-228.
- Belshaw, P.J., Walsh, C.T. and Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science*, **284**, 486-489.
- Bergendahl, V., Linne U and MA., M. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* 2002 Jan;269(2):620-9, **269**, 620-9.
- Biacore. (1995) AB Germany, Freiburg). *BIAcore*.
- Borchert, S., Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. (1994) Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J Bacteriol*, **176**, 2458-62.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brautaset, T., Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, StrLm AR, Valla S and SB, Z. (2000) Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem Biol*, **7**, 395-403.
- Bruner, S., Weber T, Kohli RM, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT and MT, S. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)* 2002 Mar;10(3):301-10, **10**, 301-10.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M. and Simonson, T.W., G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905-921. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-21.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta- galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-379.
- Byford, M.F., Baldwin, J.E., Shiau, C.Y. and Schoefield, C.J. (1997) The Mechanism of ACV Synthetase. *Chem. Rev.*, **97**, 2631-49.
- Cane, D.E. and Walsh, C.T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, R319-25.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. and Khosla, C. (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, **282**, 63-8.
- Chirgadze, N.Y., Briggs, S.L., McAllister, K.A., Fischl, A.S. and Zhao, G. (2000) Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase: an essential enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis. *Embo J*, **19**, 5281-7.
- Chuck, J.A., McPherson, M., Huang, H., Jacobsen, J.R., Khosla, C. and Cane, D.E. (1997) Molecular recognition of diketide substrates by a beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase domain within a bimodular polyketide synthase. *Chem Biol*, **4**, 757-66.
- Conti, E., Franks, N.P. and Brick, P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, **4**, 287-298.

- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. and Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J*, **16**, 4174-83.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. and van Sinderen, D. (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **8**, 821-31.
- Cronan, J.J., Birge CH and PR., V. (1969) Crystallization and characterization of a fragment of pseudouridine synthase RluC from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1969 Nov;100(2):601-4, **100**, 601-4.
- Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A. and Simpson, T.J. (1997) Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry*, **36**, 6000-8.
- Davis, N.K. and Chater, K.F. (1990) Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol Microbiol*, **4**, 1679-91.
- de Crécy-Lagard, V., Marliere, P. and Saurin, W. (1995) Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C. R. Acad. Sci. III*, **318**, 927-936.
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. and Grandi, G. (1997) Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J Biol Chem*, **272**, 25304-9.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H. and Kleinkauf, H. (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett*, **357**, 212-6.
- Doekel, S. and Marahiel, M.A. (2000) Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **7**, 373-84.
- Dreier, J. and Khosla, C. (2000) Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. *Biochemistry*, **39**, 2088-95.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D.J. and Shen, B. (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol*, **7**, 623-42.
- Du, L., Sanchez, C. and Shen, B. (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng*, **3**, 78-95.
- Ehmann, D., Gehring, AM. and CT., W. (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry*, **38**, 6171-7.
- Eppelmann, K., Doekel, S. and Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **276**, 34824-31.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry*. 2002 Jul 30;41(30):9718-26., **41**, 9718-26.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.
- Fabiane, S., Sohi MK, Wan T, Payne DJ, Bateson JH, Mitchell T and BJ, S. (1998) Crystal structure of the zinc-dependent beta-lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry* 1998 Sep 8;37(36):12404-11, **37**, 12404-11.

- Farabaugh, P.J. (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature*, **274**, 765-769.
- Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M. and Schweizer, E. (2000) A novel function of yeast fatty acid synthase. Subunit alpha is capable of self-pantetheinylation. *Eur J Biochem*, **267**, 2666-71.
- Finking, R. (2000) *Diplomarbeit*.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schafer, A., Jahn, D. and Marahiel, M.A. (2002) Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **14**, 14.
- Flickinger, M.C. and Perlman, D. (1979) Application of oxygen-enriched aeration in the production of bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 282-93.
- Flugel, R.S., Hwangbo, Y., Lambalot, R.H., Cronan, J.E., Jr. and Walsh, C.T. (2000) Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 959-68.
- Gehring, A.M. (1998) Phosphopantetheinyl Transferase Catalyzed Activation of Polyketide and Nonribosomal Peptide Synthetases and Deconvolution of Enterobactin and Yesiniabactin Siderophore Biosyntheses. *Dissertation*.
- Gehring, A.M., Lambalot, R.H., Vogel, K.W., Drueckhammer, D.G. and Walsh, C.T. (1997) Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates in vitro for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem Biol*, **4**, 17-24.
- Gehring, A.M., Mori, I. and Walsh, C.T. (1998a) Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry*, **37**, 2648-59.
- Gehring, A.M., Mori, I.I., Perry, R.D. and Walsh, C.T. (1998b) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, **37**, 17104.
- Gilbert, W. (1991) pTZ18R cloning vector from PL-Pharmacia. *Genbank ACCESSION Nr.:* L08956.
- Gill, S.C. and vonHippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Gocht, M. and Marahiel, M.A. (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*, **176**, 2654-62.
- Gokhale, R.S., Lau, J., Cane, D.E. and Khosla, C. (1998) Functional orientation of the acyltransferase domain in a module of the erythromycin polyketide synthase. *Biochemistry*, **37**, 2524-8.
- Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. and Khosla, C. (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science*, **284**, 482-5.
- Gottesman, S., Halpern, E. and Trisler, P. (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **148**, 265-273.
- Grodberg, J. and Dunn, J.J. (1988) *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.*, **170**, 1245-1253.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gutierrez, S., Diez, B., Montenegro, E. and Martin, J.F. (1991) Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol*, **173**, 2354-65.

- Healy, V.L., Park, I.S. and Walsh, C.T. (1998) Active-site mutants of the VanC2 D-alanyl-D-serine ligase, characteristic of one vancomycin-resistant bacterial phenotype, revert towards wild-type D-alanyl-D-alanine ligases. *Chem Biol*, **5**, 197-207.
- Heathcote, M.L., Staunton, J. and Leadlay, P.F. (2001) Role of type II thioesterases: evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units. *Chem Biol*, **8**, 207-20.
- Heaton, M.P. and Neuhaus, F.C. (1992) Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D-alanine-activating enzyme. *J. Bacteriol.*, **174**, 4707-4717.
- Hendrickson, W.A., Horton, J.R. and LeMaster, D.M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *Embo J.*, **9**, 1665-72.
- Hochuli, E. (1989) Aufarbeitung von Bioproteinen: Elegant und wirtschaftlich. *Chemische Industrie*, **12**, 69-70.
- Holak TA, Kearsley SK, Kim Y, JH., P. and Holkova, B. (1988) Three-dimensional structure of acyl carrier protein determined by NMR pseudoenergy and distance geometry calculations. *Biochemistry*, **27**, 6135-42.
- Hopwood, D.A. (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem. Rev.*, **97**, 2465-2497.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Minetoki, T., Kurotsu, T., Kanda, M., Miura, S., Okamura, K., Furuyama, J. and Saito, Y. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gramicidin S synthetase I gene. *J Biochem (Tokyo)*, **106**, 639-45.
- Huang, W., Jia J, Edwards P, Dehesh K, Schneider G and Y., L. (1998) Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from E.coli reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J*, **17**, 1183-91.
- IBA. (2002) Strep-tag Purification System. *Recombinant Protein Expression and Purification*. Jancarik, J. and Kim, S.H.J. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J.Appl.Cryst*, **24**, 409-411.
- Jackson, RM., Gabb, HA, Sternberg MJ. (1998) Rapid refinement of protein interfaces incorporating solvation: application to the docking problem. *J Mol Biol*, **(279)** 265-85.
- Jones, T., Zou JY, Cowan SW and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47**, 110-9.
- Jung, G. (1991) Lantibiotika - ribosomale synthetisierte Polypeptidwirkstoffe mit Sulfidbrücken und alpha,beta-Didehydroamino-säuren. *Angew. Chem.*, **103**, 1067-1084.
- Katz, L. (1997) Manipulation of Modular Polyketide Synthases. *Chem. Rev.*, **97**, 2557-2575.
- Kealey, J.T., Liu, L., Santi, D.V., Betlach, M.C. and Barr, P.J. (1998) Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 505-9.
- Keating, T., Ehmann DE, Kohli RM, Marshall CG, Trauger JW and CT., W. (2001) Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. *Chembiochem*, **2**, 99-107.
- Keating, T.A., Marshall, C.G. and Walsh, C.T. (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry*, **39**, 15522-30.
- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T. and AE., Keating. (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domain. *Nat Struct Biol*, **9**, 522-6.

- Kelly, S. and NC., P. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta*, **1338**, 161-85.
- Khosla, C. (1997) Harnessing the Biosynthetic Potential of Modular Polyketide Synthases. *Chem. Rev.*, **97**, 2577-2590.
- Kim, B.S., Cropp, T.A., Beck, B.J., Sherman, D.H. and Reynolds, K.A. (2002) Biochemical evidence for an editing role of thioesterase II in the biosynthesis of the polyketide pikromycin. *J Biol Chem*, **3**, 3.
- Kleinkauf, H. (2000) The role of 4'-phosphopantetheine in the biosynthesis of fatty acids, polyketides and peptides. *Biofactors*, **11**, 91-2.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K. and Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol*, **4**, 927-37.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 491-493.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, **3**, 923-36.
- Lambalot, R.H. and Walsh, C.T. (1996) Holo-acyl carrier protein synthase of *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.*, in press.
- Lambalot, R.H. and Walsh, C.T. (1997) Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **279**, 254-62.
- Lawson, D., Derewenda U, Serre L, Ferri S, Szittner R, W.Y., Meighen EA and ZS., D. (1994) Structure of a myristoyl-ACP-specific thioesterase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* 1994 Aug 16;33(32):9382-8, **33**, 9382-8.
- Lee, S.G., Littau, V. and Lipmann, F. (1975) The relation between sporulation and the induction of antibiotic synthesis and of amino acid uptake in *Bacillus brevis*. *J. Cell. Biol.*, **66**, 233-242.
- Lemaster, D.M. (1994) Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. *Progr.NMR Spect.*, **26**, 26.
- Leslie, A.G.W. (1990) Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at a 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **213**, 167-186.
- Lewendon, A., Murray IA, Shaw WV, Gibbs MR and AG., L. (1994) Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate. *Biochemistry*, **33**, 1944-50.
- Li J, Derewenda U, Dauter Z, Smith S and ZS., D. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nat Struct Biol* 2000 Jul;7(7):555-9, **7**, 555-9.
- Lin, J., Abeygunawardana C, Frick DN, Bessman MJ and AS, M. (1997) Solution structure of the quaternary MutT-M2+-AMPCPP-M2+ complex and mechanism of its pyrophosphohydrolase action. *Biochemistry*, **36**, 1199-211.
- Linne, U., Doekel S and MA., M. (2001) Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40**, 15824-34.
- Linne, U. and Marahiel, M.A. (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*, **39**, 10439-47.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998) Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.Berlin*.
- Luo L, Kohli RM, Onishi M, Linne U and Marahiel MA, W.C. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of

- phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry* 2002 Jul 23;41(29):9184-96, **41**, 9184-96.
- Luo, L., Burkart M.D., Stachelhaus T. and Walsh C.T. (2001) Substrate Recognition and Selection by the Initiation Module PheATE of Gramicidin S Synthetase. *J Am Chem Soc*, **123**, 11208-18.
- Luo, L. and Walsh C.T. (2001) Kinetic analysis of three activated phenylalanyl intermediates generated by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, **40**, 5329-37.
- Lust, G. and Fauer L. (1968) The inhibition of the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast by long-chain acyl coenzyme A compounds. *Eur J Biochem*, **7**, 68-72.
- Marahiel, M., Stachelhaus T and HD., M. (1997a) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev*, **97**, 2651-74.
- Marahiel, M.A. (1992a) Molecular biology and regulatory mechanisms of antibiotic production in *Bacillus*. *Naturwissenschaften*, **79**, 202-12.
- Marahiel, M.A. (1992b) Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. *FEBS Lett*, **307**, 40-3.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. and Mootz, H.D. (1997b) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.*, **97**, 2651-2673.
- Marshall, C., Burkart MD, Meray RK and Walsh CT: (2002a) Carrier protein recognition in siderophore-producing nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **41**, 8429-37.
- Marshall, C., Hillson NJ and Walsh CT. (2002b) Specific inhibition of candicidin biosynthesis by the lipogenic inhibitor cerulenin. *Biochemistry* 2002 Jan 8;41(1):244-50, **41**, 244-50.
- May, J., Kessler, N., Marahiel, M. and Stubbs, M.T. (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *PNAS*, **99**, 12120-25.
- May, J.J., Wendrich, T.M. and Marahiel, M.A. (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem*, **276**, 7209-17.
- McAllister, K.A., Peery, R.B., Meier, T.I., Fischl, A.S. and Zhao, G. (2000) Biochemical and molecular analyses of the *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase, an enzyme essential for fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem*, **275**, 30864-72.
- McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J: Biochem*, **189**, 1-23.
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D. and Kamp, R.M. (1993) Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7678-7684.
- Moche, M., Dehesh K, Edwards P and Y., L. (2001) The crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Synechocystis* sp. at 1.54 Å resolution and its relationship to other condensing enzymes. *J Mol Biol* 2001 Jan 19;305(3):491-503, **305**, 491-503.
- Modis, Y. and Wierenga, R. (1998) Two crystal structures of N-acetyltransferases reveal a new fold for CoA-dependent enzymes. *Structure*, **6**, 1345-50.
- Mofid, M. (1999a) Die posttranslationale Modifikation von Peptidsynthetase Domänen durch 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen: Kristallisation der Sfp und Untersuchung zur Aktivität. *Diplomarbeit*.
- Mofid, M., Finking R and MA., M. (2002) Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* 2002 May 10;277(19):17023-31, **277**, 17023-31.

- Mofid, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R. and Reuter, K. (1999) Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1098-100.
- Mootz, H. (1999) Charakterisierung des Biosynthese-Operons für das Peptidantibiotikum Tyrocidin und Konstruktion von Hybridpeptidsynthetasen. *Dissertationsarbeit*.
- Mootz, H.D., Finking, R. and Marahiel, M.A. (2001) 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **276**, 37289-98.
- Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol*, **179**, 6843-50.
- Mootz, H.D., Schorgendorfer, K. and Marahiel, M.A. (2002a) Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* lys5. *FEMS Microbiol Lett*, **213**, 51-7.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. and Marahiel, M.A. (2000a) Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5848-53.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Roslansky, P. and Adelman, W.J., Jr. (2002b) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal Peptide synthetases. *Chembiochem*, **6**, 490-504.
- Mootz, R.D., Hansen, D.T., Souza, T.A., Triano, J.J. and Wiese, B.C. (2000b) Application of incremental change strategies in chiropractic and multidisciplinary clinical settings for quality improvement. *Qual Manag Health Care*, **8**, 42-64.
- Naggert J, Narasimhan ML, DeVeaux L, Cho H, Randhawa ZI, Cronan JE Jr, Green BN and S., S. (1991) Cluster of genes controlling synthesis and activation of 2,3-dihydroxybenzoic acid in production of enterobactin in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1991 Jun 15;266(17):11044-50, **266**, 11044-50.
- Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J. and Zuber, P. (1992) Isolation and characterization of sfp: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet*, **232**, 313-21.
- Nelson, D. and Cox, M. (2002) Lehninger Biochemie. *Springer Verlag*, **3**.
- Neumuller, A.M., Konz, D. and Marahiel, M.A. (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem*, **268**, 3180-9.
- Nicholls, A., Sharps, K.A. and Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons; *Proteins*, **11**, 281-296.
- Nishio, C., Komura, S. and Kurahashi, K. (1983) Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 751-758.
- Otwinowski, z. (1993) In Data Collection and Processing (eds Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S.). *SERC, Daresbury Laboratory, Warrington*, 55-62.
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J. and Somers, W.S. (2000) Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure Fold Des*, **8**, 883-95.
- Payne, S.M. and Finkelstein, R.A. (1978) Siderophore production by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, **20**, 310-1.
- Perego, M., Glaser P, Minutello A, Strauch MA, Leopold K and W., F. (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis* Identification of genes and regulation. *J Biol Chem* 1995 Jun 30;270(26):15598-606, **270**, 15598-606.

- Pfeifer, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E. and Khosla, C. (2001) Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, **291**, 1790-2.
- Porath, J., Carlson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975) Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.
- Praphanphoj, V., Sacksteder KA, Gould SJ, Thomas GH and MT., G. (2001) Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase gene, the human ortholog of the yeast LYS5 gene. *Mol Genet Metab*, **72**, 336-42.
- Qiagen. (1997) The Expressionist. *Lab manual*.
- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. and Walsh, C.T. (1998a) Identification of a mycobacterium tuberculosis gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin [In Process Citation]. *Chem Biol*, **5**, 631-45.
- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. and Walsh, C.T. (1998b) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**, 1585-95.
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Walsh, C.T. and Zuber, P. (1998c) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**, 1585-1595.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. and Ficner, R. (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J*, **18**, 6823-31.
- Rich, R. and DG., M. (2000) Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2000 Feb;11(1):54-61, **11**, 54-61.
- Ritsema, T., Geiger, O., van Dillewijn, P., Lugtenberg, B.J.J. and Spaink, H.P. (1994) Serine residue 45 of nodulation protein NodF from *Rhizobium eguminosarum* bv. *viciae* is essential for its biological function. *J. Bacteriol.*, **176**, 7740-7743.
- Saito, F., Hori, K., Kanda, M., Kurotsu, T. and Saito, Y. (1994) Entire nucleotide sequence for *Bacillus brevis* Nagano Grs2 gene encoding gramicidin S synthetase 2: a multifunctional peptide synthetase. *J Biochem (Tokyo)*, **116**, 357-67.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Miklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruft, V. and Wittmann-Liebold, B. (1991) An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J Biol Chem*, **266**, 23135-41.
- Schmidt, T., Koepke J, Frank R and A., S. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, **255**, 753-66.
- Schneider, A. and Marahiel, M.A. (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, **169**, 404-10.
- Schroeder, G. (2002) Untersuchungen zum katalytischen Mechanismus der im Surfactin A - Biosyntheseoperon kodierten TypII Thioesterase TEII srf. *Diplomarbeit* 2002.
- Schwarzer, D. (2002) Die Thioesterasen der nichtribosomalen Peptidsynthese: Funktionsanalyse durch biochemische Charakterisierung. *Dissertation*.
- Schwarzer, D. and Marahiel, M.A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, **88**, 93-101.

- Schwarzer, D., Mootz HD, Linne U and Marahiel, M. (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14083-8.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (2001) Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **8**, 997-1010.
- Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Dohren, H., Kleinkauf, H. and van Liempt, H. (1992) Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha-amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Eur. J. Biochem.*, **205**, 687-94.
- Schweizer, E. (1996) Fettsäuresynthasen- Funktionsstrategien eines Multienzyms. *Naturwissenschaften Aufsätze*, **83**, 347-58.
- Schweizer, M., Lebert C, Holtke J, Roberts LM and E., S. (1984) Molecular cloning of the yeast fatty acid synthetase genes, FAS1 and FAS2: illustrating the structure of the FAS1 cluster gene by transcript mapping and transformation studies. *Mol Gen Genet* 1984;194(3):457-65, **194**, 457-65.
- Shiau, C.Y., Baldwin, J.E., Byford, M.F., Sobey, W.J. and Schofield, C.J. (1995) delta-L-(alpha-amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase: the order of peptide bond formation and timing of the epimerisation reaction. *FEBS Lett*, **358**, 97-100.
- Sieber, S., Linne, U., Hillson, N., Roche, E., Walsh, C. and Marahiel, M. (2002) Evidence for a monomeric structure of nonribosomal Peptide synthetases. *Chem Biol*, **9**, 997.
- Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S. and Muller, R. (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem*, **274**, 37391-9.
- Stachelhaus, T., Huser, A. and Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol*, **3**, 913-21.
- Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. (1995a) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett*, **125**, 3-14.
- Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. (1995b) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem*, **270**, 6163-9.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. and Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem*, **273**, 22773-81.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, 493-505.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (eds.) (2002) *Nonribosomal Assembly of Peptide Antibiotics on Modular Protein Templates*. ASM Press, Washington D.C.
- Stachelhaus, T. and Walsh, C.T. (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, **39**, 5775-87.
- Staunton, J. (1998) Combinatorial biosynthesis of erythromycin and complex polyketides. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 339-45.
- Staunton, J., Caffrey, P., Aparicio, J.F., Roberts, G.A., Bethell, S.S. and Leadlay, P.F. (1996) Evidence for a double-helical structure for modular polyketide synthases. *Nat Struct Biol*, **3**, 188-92.
- Stein, D.B. (2002) Katalytische Aktivität von E-Domänen aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen gegenüber löslichen Substraten und Protein-Protein-Interaktion innerhalb des Tyrocidin Biosynthese-Operons vermittelt durch E-Domänen. *Diplomarbeit*.

- Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A. and Wittmann-Liebold, B. (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry*, **34**, 4633-42.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. and Morris, H.R. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem*, **271**, 15428-35.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. and Morris, H.R. (1994) Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L- valine of gramicidinS synthetase 2. *FEBS Lett.*, **340**, 39-44.
- Stoops, J. and SJ., W. (1980) Yeast fatty acid synthetase: structure-function relationship and nature of the beta-ketoacyl synthetase site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4544-8.
- Stoops, J. and SJ., W. (1982) Animal fatty acid synthetase. Identification of the residues comprising the novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase site and their role in its cold inactivation. *J Biol Chem* 1982 Mar 25;257(6):3230-5, **257**, 3220-5.
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G. (1990) System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In Levkovits, I. and Pernis, B. (eds.), *Immunological Methods*, pp. 121-152.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Stuible, H.P., Meier, S. and Schweizer, E. (1997) Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine:protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur J Biochem*, **248**, 481-7.
- Tsai, S.C., Miercke, L.J., Krucinski, J., Gokhale, R., Chen, J.C., Foster, P.G., Cane, D.E., Khosla, C. and Stroud, R.M. (2001) Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: versatility from a unique substrate channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14808-13.
- Tseng, C., Bruner SD, Kohli RM, Marahiel MA, Walsh CT and SA, S. (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*, **41**, 13350-9.
- Turgay, K., Krause, M. and Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol*, **6**, 2743-4.
- Vallari, D., Jackowski S and CO., R. (1987) Regulation of pantothenate kinase by coenzyme A and its thioesters. *J Biol Chem* 1987 Feb 25;262(6):2468-71, **262**, 2468-71.
- van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J. and Solenberg, P.J. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol*, **5**, 155-62.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 615-619.
- Voss, S. and A., S. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, **10**, 975-82.
- Wagner, G. (1997) An account of NMR in structural biology; *Nat.Struct.Biol. Nat.Struct.Bio*, **4**, 841-44.
- Walsh, CT. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406**, 775-81.

- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A. and Patel, H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 525-34.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E. and Flugel, R.S. (1997) Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 309-15.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. and Leitner, E. (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet*, **26**, 120-5.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A. and Holak, T.A. (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold Des*, **8**, 407-18.
- Weber, T. and Marahiel, M.A. (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure (Camb)*, **9**, R3-9.
- Witkowski, A., Joshi AK, Rangan VS, Falick AM, Witkowska HE and S., S. (1998) Dibromopropanone cross-linking of the phosphopantetheine and active-site cysteine thiols of the animal fatty acid synthase can occur both inter- and intrasubunit. Reevaluation of the side-by-side, antiparallel subunit model. *J Biol Chem*, **274**, 11557-63.
- Wong, H., Liu G, Zhang YM, Rock CO and J., Z. (2002) The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **277**, 15874-80.
- Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids; Wiley, New York. *Wiley, New York*.
- Wüthrich, K. (1998) The second decade-into the third millenium; *Nat.Struct.Biol.* *Nat.Struct.Bio*, **5**, 492-95.
- Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E. and Payne, S.M. (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of gene required for early steps in siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **179**, 7055-7061.
- Xu, G.Y., Tam, A., Lin, L., Hixon, J., Fritz, C.C. and Powers, R. (2001) Solution structure of *B. subtilis* acyl carrier protein. *Structure (Camb)*, **9**, 277-87.
- Yang, J.T. (1986) secondary structure of protein with CD. *Enzymology*, **130**, 208-269.
- Zamenhof, P.J. and Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **110**, 171-178.
- Zhang, Y., Rao MS, Heath RJ, Price AC, Olson AJ, Rock CO and SW., W. Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on beta-ketoacyl-ACP synthase III. *J Biol Chem* 2001, **276**, 8231-8.

8. Anhang

8.1: Core-Motiv:

8.1.1. Core-Motiv der wichtigsten Domänen von Peptidsynthetasen.

Die Core-Motiven ergaben sich aus den Sequenzvergleichen verschiedener Peptidsynthetasegene komplett aufgeklärter Biosynthesekuster (Konz *et al.*, 1997; Marahiel *et al.*, 1997b; Quadri *et al.*, 1998a).

Tabelle 8.5: Konservierte Core-Motive der Domänen.

Domäne	Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
A-Domäne	A1	L(TS)YxEL
	A2 (Core 1)	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3 (Core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6 (Core 3)	GELxIxGx(VL)ARGYL
	A7 (Core 4)	Y(RK)TGDL
	A8 (Core 5)	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
PCP-Domäne	T (Core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(LI)(K/R)
C-Domäne	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RDxSRNPL
E-Domäne	E1	PIQxWF
	E2 (His)	HHxISDG(WV)S
	E3 (race A)	DxLLxAxG
	E4 (race B)	EGHGRE
	E5 (race C)	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	E6	PxxGxGYG
	E7 (race D)	FNYLG(QR)
Te-Domäne	Te1	G(HY)SxG
	Te2	GxH
TEII	TE1	GHSxG
	TE2	GxH

8.1.2. Core-Motiv von PPTasen.

Tabelle 8.6: Konservierte Core-Motive der PPTasen

Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
P1	(SN)(LI)(ST)H
P2	(IV)GxD(VI)
P3	KE(SA)xxKx

8.2 Oligonukleotide

Tabelle 8.3: Verwendete Oligonukleotide⁴.

Primer Nr.	Name	Sequenz 5'-.....-3'	Verwendete Plasmid
P1	5'-SfpD40A	CGGAGATTTTATCATAAAGAAGCTGCTCACCGCACCCTGC	PQE60-Sfp
P2	3'-SfpD40A	GCAGGGTGCGGTGAGCAGCTTCTTTATGATAAAATCTCCG	PQE60-Sfp
P3	5'-SfpD40K	CGGAGATTTTATCATAAAGAAAAGGCTCACCGCACCCTGC	PQE60-Sfp
P4	3'-SfpD40K	GCAGGGTGCGGTGAGCCTTTTCTTTATGATAAAATCTCCG	PQE60-Sfp
P5	5'-T44S-ClaI	CTCATCGATCCCTGCTGGGAGATGTG	pQE60-Sfp
P6	3'-T44S-ClaI	GGGATCGATGAGCATCTTCTTTATG	pQE60-Sfp
P7	5'-K75N-EcoO65I	ATAC <u>GGTAACCC</u> GTGCATCCCTGAT	pQE60-Sfp
P8	3'-K75N-EcoO65I	AAAG <u>GGTTACCG</u> TATTCCTGCGTGCT	pQE60-Sfp
P9	5'-S89L-NotI	TATAGCGGCCGCTGGGTCAATTGGT	pQE60-Sfp
P10	3'-S89L-NotI	AACAGCGGCCGCTGTGCAGAAATGTTGAAA	pQE60-Sfp
P11	3'-H90A-NotI	AACAGCGGCCGCTGGCAGAAATGTTGAA	pQE60-Sfp
P12	3'-H90N-NotI	AACAGCGGCCGCTGTTAGAAATGTTGAA	pQE60-Sfp
P13	5'-D107N-Asel	GATTACAGCCGATCGGCATTAATATCGAAAAAACGAAACCG	pQE60-Sfp
P14	3'-D107N-Asel	CGGTTTCGTTTTTCGATATTAATGCCGATCGGCTGTGAATC	pQE60-Sfp
P15	5'-D107E-HincII	TTAAGTCAACCGATCGGCATAGAAATCGAA	pQE60-Sfp
P16	3'-D107E-HincII	GATCGGTTGACTATCAAACGCACCAAT	pQE60-Sfp
P17	5'-E109D-ClaI	GATATCGATAAAACGAAACCGATCAGC	pQE60-Sfp
P18	3'-E109D-ClaI	TTTATCGATATCTATGCCGATCGGCTG	pQE60-Sfp
P19	5'-K112A-EcoRV	CGATCGGCATAGATATTGAAAAAACGGCACCGATCAGCCTTGA	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P20	3'-K112A-EcoRV	CTCAAGGCTGATCGGTGCCGTTTTTTCAATATCTATGCCGATC	pQE60-Sfp
P21	5'-E117A-NheI	CGAAAAAACGAAACCGATCTCGCTAGCGATCGCCAAGCGCTT	pQE60-Sfp
P22	3'-E117A-NheI	GAAGCGCTTGGCGATCGCTAGCGAGATCGGTTTCGTTTTTTC	pQE60-Sfp
P23	5'-K120A-HaeII	CAGCCTTGAGATCGCCGCCCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTAC	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P24	3'-K120A-HaeII	GTACTCTGTTTTTGAAAAGAAGCGGGCGGCGATCTCAAGGCT	pQE60-Sfp
P25	5'-E127A-RsaI	CAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGCCTACAGCGACCTTTTAGC	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P26	3'-E127A-RsaI	GCTAAAAGGTCGCTGTAGGCTGTTTTTGAAAAGAAGCGCTTG	pQE60-Sfp
P27	5'-K150A	CTATGGTCAATGGCAGAAAGCTTTATCAAACAG	pQE60-Sfp
P28	3'-K150A	GATAAAGCTTTCTGCCATTGACCATAGATAAAAATA	pQE60-Sfp
P29	5'-E151S-SacI	GAAGAGCTCCTTTATCAAACAGGAAGGC	
P30	3'-E151S-SacI	AAAGGAGCTCTTCATTGACCATAGATGATA	
P31	5'-E151Q-HindIII	CATCTATGGTCAATGAAACAGAGCTTTATCAAACAGGAAGGC	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P32	3'-E151Q-HindIII	GCCTTCCTGTTTGATAAAGCTCTGTTTCATTGACCATAGATG	pQE60-Sfp
P33	5'-K155A-HindIII	GGTCAATGAAAGAGAGCTTTATCGCACAGGAAGGCAAAGGC	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P34	3'-K155A-HindIII	GCCTTGCCTTCCTGTGCGATAAAGCTCTCTTTCATTGACC	pQE60-Sfp
P35	5'-K155R-HindIII	CTATGGTCAATGAAAGAGAGCTTTATCAGACAGGAAGGCAAAG	pQE60-Sfp (verlust von Schnittstelle)
P36	3'-K155R-	CTTTGCCTTCCTGTCTGATAAAGCTCTCTTTCATTGACCATAG	pQE60-Sfp

⁴ Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen

	HindIII		
P37	5'-SfpH1-HindIII	CATCACTAAGCTTAATTAGCTGAG	PQE60-Sfp
P38	3'-SfpH1-HindIII	TTTTAAGCTTGCTGTGAATCAAACGCACCAA	PQE60-Sfp
P39	5'-SfpH2-SphI	AAAAGCATGCCGATCGGCATAGATATCGA	PQE60-Sfp
P40	3'-SfpH2-BglII	TTTTAGATCTCTAGGGGAAATCAGGGTGTGC	PQE60-Sfp
P41	5'-Sfp165	CTT TAT CAA ACA AGG AAG GCA AAG GCT TAT CGC	PQE60-Sfp
P42	3'-Sfp165	CTT TGC CTT CCT TGT TTG ATA AAG CTT TCT TTC	PQE60-Sfp
P43	5'-VKM5-SphI	AATTGCATGCAATATGTCGCGCCGACAAATGC	pQE70-PCP
P44	5'-VKM9-SphI	AATTGCATGCCGACAAATGCGGTGGAAAGG	pQE70-PCP
P45	3'-AllgTycC3-SphI	ACGGGCATGCTTAATTTCTCCTCTTTAATG	pQE70-PCP
P46	5'-TycC3S45A	GATCGGCGGACATGCCTTGAAAGCGATGGCTG	pQE70-PCP
P47	3'-TycC3S45A	CATCGCTTTCAAGGCATGTCCGCCGATCTGG	pQE70-PCP
P48	5'-TycC3S45C	CATCGCTTTCAAGCAATGTCCGCCGATCTGG	pQE70-PCP
P49	3'-TycC3S45C	GATCGGCGGACATTGCTTGAAAGCGATGGCTG	pQE70-PCP
P50	5'-PCPK47A-NcoI	GCGGACATTCCTTGCGAGCCATGGCTGTCGCTGCAC	pQE70-PCP
P51	3'-PCPK47A-NcoI	GTGCAGCGACAGCCATGGCTGCCAAGGAATGTCCGC	pQE70-PCP
P52	5'-PCPK47D-NcoI	GCGGACATTCCTTGCGAGCCATGGCTGTCGCTGCAC	pQE70-PCP
P53	3'-PCPK47D-NcoI	GTGCAGCGACAGCCATGGCGTCCAAGGAATGTCCGC	pQE70-PCP
P54	5'-HtycA-SpeI	TTTAAGTAGTTATGGAAGCTTGAAGACTATCAATTGAAGCTAGAG ACGAAAGAC	PCP von TycA in pQE60-TycA
P55	3'-HtycA-SpeI	ATATACTAGTTCAACTACATCTAGCGAATCTCCGCCGAGCGAG	PCP von TycA in pQE60-TycA
P56	5'-Pro(V1)-SacI	CGCTGGGCGGCGATTCTGTTAGACGCGATTGAGCTCATTTC	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P57	3'-Pro(V1)-SacI	GGAAATGAGCTCAATCGCGTCTAACGAATCGCCGCCAGCG	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P58	5'-Pro(V2)	GCTCATTTCGCGCATCGAAGACGAATGCCAGGCGGATG	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P59	3'-Pro(V2)	CATCCGCCTGGCATTCTGTTCTGATGCGGGAAATGAGC	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P60	5'-Pro-NheI-K47A	CTGGGCGGCCATTCTGCTAGCAGCGATTGAGCTCATTTC	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P61	3'-Pro-NheI-K47A	GGAAATGAGCTGAATCGCTGCTAGCGAATGGCCGCCAG	PCP von ProCAT in pQE60-ProCAT oder pQE60- ProCATLeuCATTe
P62	5'-ProCATK47D-XbaI	GCTGGGCGGCCATTCTCTAGACGCGATTGAGCTCATTTC	PCP von ProCATinpQE60- ProCAToderpQE60- ProCATLeuCATTe
P63	3'-ProCATK47D-XbaI	GGAAATGAGCTGAATCGCGTCTAGAGAATGGCCGCCAGC	PCP von ProCATinpQE60- ProCAToderpQE60- ProCATLeuCATTe

8.3. Screening-Lösungen zur Kristallisation

8.3.1. Screening Lösungen nach “Hampton Research”

Tabelle 8.4: Hampton Research Crystal Screen 1⁵.

number	[Salt]	Salt	unit	Buffer	pH	Precipitant	unit	Precipitant 1
1	0,02 M	Calcium chloride dihydrate	0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	30 %v/v	2-methyl-2,4-pentanediol	Potassium sodium tartrate
2						0,4 M	tetrahdrate	
3						0,4 M	Ammonium dihydrogen phosphate	
4			0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	2 M	Ammonium sulfate	
5	0,2 M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1 M	Sodium HEPES	7,5	30 %v/v	2-methyl-2,4-pentanediol	
6	0,2 M	magnesium chloride hexahdrate	0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
7			0,1 M	sodium cacodylate	6,5	1,4 M	sodium acetate trihydrate	
8	0,2 M	tri-sodium citrate dihydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	30 %v/v	iso-propanol	
9	0,2 M	ammonium acetate	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
10	0,2 M	ammonium acetate	0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
11			0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	1 M	Ammonium dihydrogen phosphate	
12	0,2 M	magnesium chloride hexahdrate	0,1 M	Sodium HEPES	7,5	30 %v/v	iso-propanol	
13	0,2 M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	30 %v/v	polyethylene glycol 400	
14	0,2 M	Calcium chloride dihydrate	0,1 M	Sodium HEPES	7,5	28 %v/v	polyethylene glycol 400	
15	0,2 M	ammonium sulfate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	30 %w/v	polyethylene glycol 8000	
16			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	1,5 M	lithium sulfate monohdrate	
17	0,2 M	lithium sulfate monohdrate	0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
18	0,2 M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	20 %w/v	polyethylene glycol 8000	
19	0,2 M	ammonium acetate	0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	30 %v/v	iso-propanol	
20	0,2 M	ammonium sulfate	0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	25 %w/v	polyethylene glycol 4000	
21	0,2 M	magnesium acetate tetrahydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	30 %v/v	2-methyl-2,4-pentanediol	

⁵ Alle Lösungen enthalten 0.02% NaN₃

number	[Salt]	Salt	unit	Buffer	pH	Precipitant	unit	Precipitant 1
22	0,2 M	sodium acetate trihydrate	0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
23	0,2 M	magnesium chloride hexahydrate	0,1 M	Sodium HEPES	7,5	30 %v/v	polyethylene glycol 400	
24	0,2 M	Calcium chloride dihydrate	0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	20 %v/v	iso-propanol	
25			0,1 M	imidazole	6,5	1 M	sodium acetate trihydrate	
26	0,2 M	ammonium acetate	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	30 %v/v	2-methyl-2,4-pentanediol	
27	0,2 M	tri-Sodium citrate dihydrate	0,1 M	Sodium HEPES	7,5	20 %v/v	iso-propanol	
28	0,2 M	sodium acetate trihydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	30 %w/v	polyethylene glycol 8000	
29			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	0,8 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	
30	0,2 M	ammonium sulfate				30 %w/v	polyethylene glycol 8000	
31	0,2 M	ammonium sulfate				30 %w/v	polyethylene glycol 4000	
32						2 M	Ammonium sulfate	
33						4 M	sodium formate	
34			0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	2 M	sodium formate	
35			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	0,8 M	sodium dihydrogen phosphate	
36			0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	8 %w/v	polyethylene glycol 8000	
37			0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	8 %w/v	polyethylene glycol 4000	
38			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	1,4 M	tri-sodium citrate dihydrate	
39			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	2 %v/v	polyethylene glycol 400	
40			0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	20 %v/v	iso-propanol	
41			0,1 M	Sodium HEPES	7,5	10 %v/v	iso-propanol	
42	0,05 M	potassium dihydrogen phosphate				20 %w/v	polyethylene glycol 8000	
43						30 %w/v	polyethylene glycol 1500	
44						0,2 M	magnesium formate	
45	0,2 M	zinc acetate dihydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	18 %w/v	polyethylene glycol 8000	
46	0,2 M	calcium acetate hydrate	0,1 M	sodium cacodylate	6,5	18 %w/v	polyethylene glycol 8000	
47			0,1 M	Sodium acetate trihydrate	4,6	2 M	Ammonium sulfate	
48			0,1 M	Tris hydrochloride	8,5	2 M	Ammonium dihydrogen phosphate	
49	1 M	lithium sulfate monohydrate				2 %w/v	polyethylene glycol 8000	
50	0,5 M	lithium sulfate monohydrate				15 %w/v	polyethylene glycol 8000	

Tabelle 8.5: Hampton Research Crystal Screen 2⁶

number	[Salt] units	Salt	[Buffer] units	Buffer	pH	Precipitant units	Precipitant
1	2,0 M	sodium chloride				10 %	PEG 6000
2	0,5 M	sodium chloride				0,01 M	hexadecyltrimethylammonium bromide
3	0,01 M	magnesium chloride hexahydrate				25 %v/v	ethylene glycol
4						35 %v/v	dioxane
5	2,0 M	ammonium sulfate				5 %v/v	iso-propanol
6					7,0	1 M	imidazole
7						10 %w/v	polyethylene glycol 1000
8	1,5 M	sodium chloride				10 %v/v	ethanol
9			0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	2 M	sodium chloride
10	0,2 M	sodium chloride	0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	30 %v/v	MPD
11	0,01 M	cobaltous chloride hexahydrate	0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	1 M	1,6 hexanediol
12	0,1 M	cadmium chloride dihydrate	0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	30 %v/v	polyethylene glycol 400
13	0,2 M	ammonium sulfate	0,1 M	sodium acetate trihydrate	4,6	30 %v/v	polyethylene glycol monomethyl ether
14	0,2 M	potassium sodium tartrate tetrahydrate	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	2 M	ammonium sulfate
15	0,5 M	ammonium sulfate	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	1 M	lithium sulfate monohydrate
16	0,5 M	sodium chloride	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	2 %v/v	ethylene imine polymer
17			0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	35 %v/v	tert-butanol
18	0,01 M	ferric chloride hexahydrate	0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	10 %v/v	jeffamine M-600
19			0,1 M	tri-sodium citrate dihydrate	5,6	2,5 M	1,6 hexanediol
20			0,1 M	MES	6,5	1,6 M	magnesium sulfate heptahydrate
21	0,1 M	sodium dihydrogen phosphate	0,1 M	MES	6,5	2 M	sodium chloride
22	0,1 M	potassium dihydrogen phosphate	0,1 M	MES	6,5	12 %w/v	polyethylene glycol 20,000
23	1,6 M	ammonium sulfate	0,1 M	MES	6,5	10 %v/v	dioxane
24	0,05 M	cesium chloride	0,1 M	MES	6,5	30 %v/v	jeffamine M-600
25	0,01 M	cobaltous chloride hexahydrate	0,1 M	MES	6,5	1,8 M	ammonium sulfate

⁶ Alle Lösungen enthalten 0.02% NaN₃

number	[Salt]	units	Salt	[Buffer]	units	Buffer	pH	Precipitant	units	Precipitant
26	0,2 M		ammonium sulfate	0,1 M		MES	6,5	30 %w/v		polyethylene glycol monomethyl ether
27	0,01 M		zinc sulfate heptahydrate	0,1 M		MES	6,5	25 %v/v		polyethylene glycol monomethyl ether
28							6,5	1,6 M		tri-sodium citrate dihydrate
29	0,5 M		ammonium sulfate	0,1 M		HEPES	7,5	30 %v/v		MPD
30						HEPES	7,5	10 %w/v		polyethylene glycol 6000
31						HEPES	7,5	20 %v/v		jeffamine M-600
32	0,1 M		sodium chloride	0,1 M		HEPES	7,5	1,6 M		ammonium sulfate
33				0,1 M		HEPES	7,5	2 M		ammonium formate
34	0,05 M		cadmium sulfate hydrate	0,1 M		HEPES	7,5	1 M		sodium acetate trihydrate
35				0,1 M		HEPES	7,5	70 %v/v		MPD
36				0,1 M		HEPES	7,5	4,3 M		sodium chloride
37				0,1 M		HEPES	7,5	10 %w/v		polyethylene glycol 8000
38				0,1 M		HEPES	7,5	20 %w/v		polyethylene glycol 10,000
39	0,2 M		magnesium chloride hexahydrate	0,1 M		tris	8,5	3,4 M		1,6 hexanediol
40				0,1 M		tris	8,5	25 %v/v		tert-butanol
41	0,01 M		nickel (II) chloride hexahydrate	0,1 M		tris	8,5	1 M		lithium sulfate monohydrate
42	1,5 M		ammonium sulfate	0,1 M		tris	8,5	12 %v/v		glycerol anhydrous
43	0,2 M		ammonium dihydrogen phosphate	0,1 M		tris	8,5	50 %v/v		MPD
44				0,1 M		tris	8,5	20 %v/v		ethanol
45	0,01 M		nickel (II) chloride hexahydrate	0,1 M		tris	8,5	20 %w/v		polyethylene glycol monomethyl ether
46	0,1 M		sodium chloride	0,1 M		bicine	9,0	20 %w/v		polyethylene glycol monomethyl ether
47				0,1 M		bicine	9,0	2 M		magnesium chloride hexahydrate
48				0,1 M		bicine	9,0	2 %v/v		dioxane

8.3.2. Screening Lösungen nach “Jancarik und Kim“ (Factorials)

Tabelle 8.6: Factorials⁷

Nr.	Konz. in M	Puffer	Konzentration in M	Salz	Konzentration	Präzipitant:	pH	Bemerkung
1	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl ₂	30.0 %	MPD	4.6	
2	0.10	MES/NaOH	0.10	K/Na-Tartrat		-	6.4	
3		-		-	0.4 M	(NH ₄)H ₂ PO ₄	6.4	NH ₄ OH eingestellt
4	0.10	Tris/HCl		-	3.0 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	8.3	
5	0.10	HEPES/NaOH	0.19	Na-Citrat	19.0 %	MPD	7.5	
6	0.10	Na Acetat	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 4000	4.5	not filtered
7	0.10	HEPES/NaOH	1.20	Na-Citrat		-	7.9	
8	0.20	Na-Citrat		-	2.0 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6	H ₂ SO ₄ eingestellt
9	0.10	Na-Citrat	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 400	5.9	
10	0.10	Na Acetat		-	1.5 %	(NH ₄)H ₂ PO ₄	5.9	NH ₄ OH eingestellt
11	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 %	(K/Na)-Phosphat	6.6	
12	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Citrat	20.0 %	PEG 400	8.9	
13	0.10	HEPES/NaOH	0.20	CaCl ₂	25.0 %	PEG 4000	7.0	not filtered
14	0.10	MES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 8000	6.1	not filtered
15	0.10	Na-Citrat	0.19	Li ₂ SO ₄	29.0 %	PEG 4000	5.9	not filtered
16		-	0.20	Li ₂ SO ₄	1.0 M	Na-Acetat	8.2	old pH 4.2
17	0.07	Tris/HCl	0.13	(NH ₄)H ₂ PO ₄	20.0 %	MPD	6.5	old pH 7.4
18	0.10	Tris/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	2.0 %	(K/Na)-Phosphat	6.6	
19	0.10	Na-Citrat	0.10	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.1	not filtered
20	0.10	MES/NaOH		-	30.0 %	MPD	6.2	
21	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 400	7.1	
22	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Acetat	30.0 %	PEG 4000	8.4	not filtered

⁷ Alle Lösungen enthalten 0.02% NaN₃

Nr.	Konz. in M	Puffer	Konzentration in M	Salz	Konzentration	Präzipitant:	pH	Bemerkung
23	0.10	Tris/HCl		-	1.0 M	K/Na-Tartrat	9.1	
24	0.10	Tris/HCl	0.20	CaCl ₂		-	8.4	
25	0.07	Na-Citrat	0.33	NH ₄ -Acetat	20.0 %	MPD	6.4	
26	0.10	MES/NaOH	2.00	Na-Acetat		-	6.9	
27	0.10	MES/NaOH	0.20	K/Na-Tartrat	30.0 %	PEG 8000	6.5	not filtered
28	0.10	HEPES/NaOH	1.00	K/Na-Tartrat		-	7.7	
29	0.10	Na Acetat	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 400	4.8	
30	0.10	HEPES/NaOH	0.10	(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0 %	PEG 4000	7.3	not filtered
31	0.10	MES/NaOH	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄		-	6.8	
32	0.10	MES/NaOH	0.20	NaCl	30.0 %	Ethanol	6.2	
33	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	Ethanol	7.0	
34	0.10	Tris/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	Ethanol	8.2	
35	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl ₂	30.0 %	Ethanol	4.5	old pH 5.3
36	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Acetat	30.0 %	Ethanol	7.4	
37	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	29.0 %	Isopropanol	6.9	
38	0.10	HEPES/NaOH		-	30.0 %	MPD	7.3	
39	0.10	Na Acetat		-	2.0 M	Na-Formiat	5.3	
40	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Citrat	30.0 %	Isopropanol	7.5	
41	0.10	HEPES/NaOH		-	20.0 %	PEG 4000	7.4	not filtered
				-	10.0 %	Isopropanol		
42	0.10	HEPES/NaOH		-	1.0 M	Li ₂ SO ₄	7.5	
43	0.10	Tris/HCl	0.20	Li ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 4000	8.6	not filtered
44	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 6000	7.2	not filtered
45	0.10	Na Acetat		-	1.5 M	Na-Acetat	6.1	
46		-	0.10	Na-Citrat	1.0 M	(NH ₄)H ₂ PO ₄	4.9	old pH 6.1
47		-		-	4.0 M	Na-Formiat	8.4	
48	0.10	HEPES/NaOH		-	1.2 M	Na-Citrat	7.9	

Nr.	Konz. in M	Puffer	Konz in M.	Salz	Konz in M.	Präzipitanz:	pH	Bemerkung
49	-	-	0.40	K/Na-Tartrat	-	-	8.2	
50	0.10	Tris/HCl	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	8.2	
51	0.10	Tris/HCl	0.20	MgCl ₂	30.0 %	MPD	8.3	
52	0.10	MES	0.20	Na-Citrat	30.0 %	Isopropanol	6.3	old pH 7.7
53	0.10	Na-Citrat	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 4000	6.4	not filtered
54	0.10	Na Acetat	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 4000	5.7	not filtered
55	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Citrat	30.0 %	PEG 400	8.0	old pH 8.8
56	0.10	HEPES/NaOH	0.20	CaCl ₂	28.0 %	PEG 400	7.2	
57	0.10	MES	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.3	not filtered
58	0.20	Imidazol/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	MPD	7.1	
59	0.10	Tris/HCl	0.20	(NH ₄) ₂ PO ₄	30.0 %	Isopropanol	6.3	
60	0.10	Na Acetat	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	25.0 %	PEG 4000	4.7	not filtered
61	0.10	MES	-	-	30.0 %	MPD	6.1	old pH 7.3
62	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl ₂	30.0 %	Isopropanol	4.5	old pH 5.2
63	0.10	Imidazol/HCl	0.50	Na-Acetat	-	-	7.6	
64	0.10	Imidazol/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	MPD	7.2	
65	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Citrat	18.0 %	Isopropanol	6.6	old pH 7.5
66	0.10	MES	0.20	Na-Acetat	30.0 %	PEG 8000	5.9	old pH 6.5
67	0.10	HEPES/NaOH	0.80	K/Na-Tartrat	-	-	7.6	
68	-	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 400	5.7	
69	-	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 4000	6.0	not filtered
70	-	-	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	5.8	
71	0.10	HEPES/NaOH	-	-	1.6 M	(K/Na)-Phosphat	9.0	made with
72	0.10	Tris/HCl	-	-	4.0 %	PEG 400	4.8	old pH 8.4
73	0.10	Na Acetat	-	-	2.0%	PEG 4000	4.5	
74	0.10	HEPES/NaOH	1.02	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 %	PEG 4000	7.6	
75	0.10	Na-Citrat	-	-	20.0 %	PEG 4000	8.8	old pH 6.7
					20.0 %	Isopropanol		

Nr.	Konz. in M	Puffer	Konz in M.	Salz	Konz in M.	Präzipitanz:	pH	Bemerkung
76	0.10	Tris/HCl	0.20	(NH ₄)H ₂ PO ₄	25.0 %	PEG 8000	6.4	not filtered
77	0.10	MES	1.40	Na-Acetat	-	-	6.8	
78	0.10	MES	0.20	Mg-Acetat	20.0 %	PEG 8000	6.4	not filtered
79	0.10	Tris/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	Isopropanol	8.3	
80	0.10	MES	0.20	Mg-Acetat	30.0 %	MPD	6.4	old pH 7.0
81	0.09	Na-Citrat	0.19	NH ₄ -Acetat	22.0 %	MPD	6.3	
82	-	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.0	not filtered
83	0.10	Tris/HCl	-	-	8.0 %	PEG 8000	8.5	
84	0.10	Na Acetat	-	-	8.0 %	PEG 4000	4.7	
85	-	-	0.05	K ₂ HPO ₄	20.0 %	PEG 8000	9.4	not filtered
86	-	-	-	-	30.0 %	PEG 1000	7.2	old pH 6.5
87	-	-	0.20	Mg-Formiat	-	-	7.3	
88	0.10	MES	0.20	Zn-Acetat	18.0 %	PEG 8000	6.3	not filtered
89	0.10	MES	0.20	Ca-Acetat	18.0 %	PEG 8000	6.5	not filtered
90	0.10	Na Acetat	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	4.5	
91	-	-	1.00	Li ₂ SO ₄	2.0 %	PEG 8000	6.7	
92	-	-	0.86	Li ₂ SO ₄	9.0 %	PEG 8000	6.7	
93	0.10	HEPES/NaOH	1.50	Li ₂ SO ₄	-	-	7.7	
94	0.10	HEPES/NaOH	0.10	Na-Citrat	40.0 %	MPD	7.0	old pH 7.7
95	0.10	HEPES/NaOH	1.35	Na-Citrat	-	-	7.8	
96	0.10	HEPES/NaOH	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 %	PEG 400	7.6	

8.4. NMR-Spektren von TEII aus Srf-TE (*B. subtilis*)

Abb. 8.1: [^{15}N , ^1H]-HSQC-TROSY-Spektrum mit $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -SrfTEII, AV700, T= 298 K, 0.74 mM

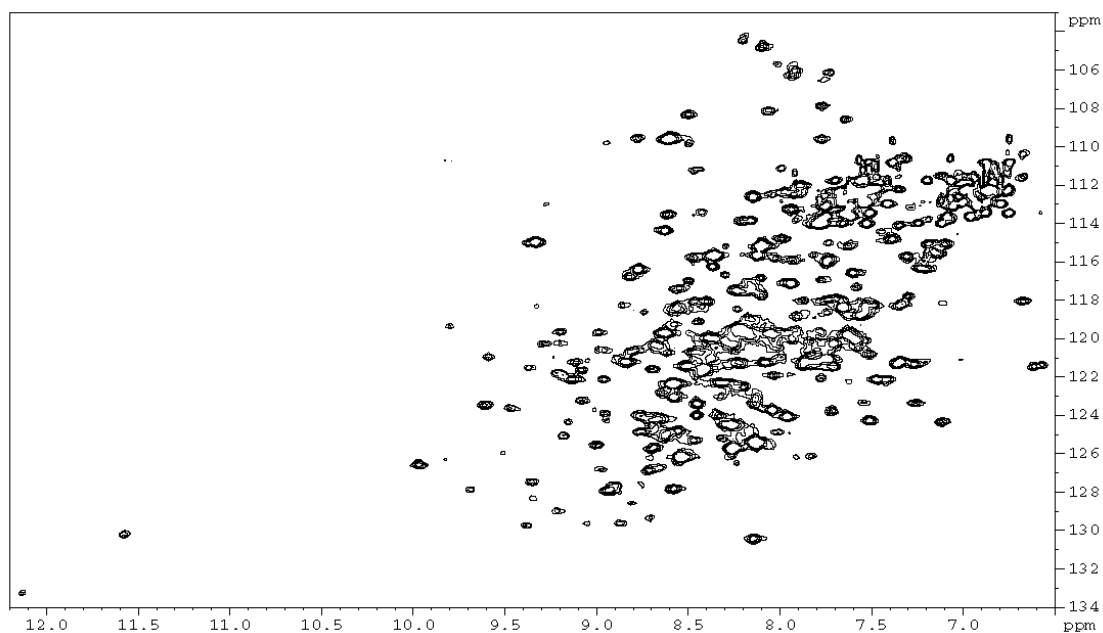
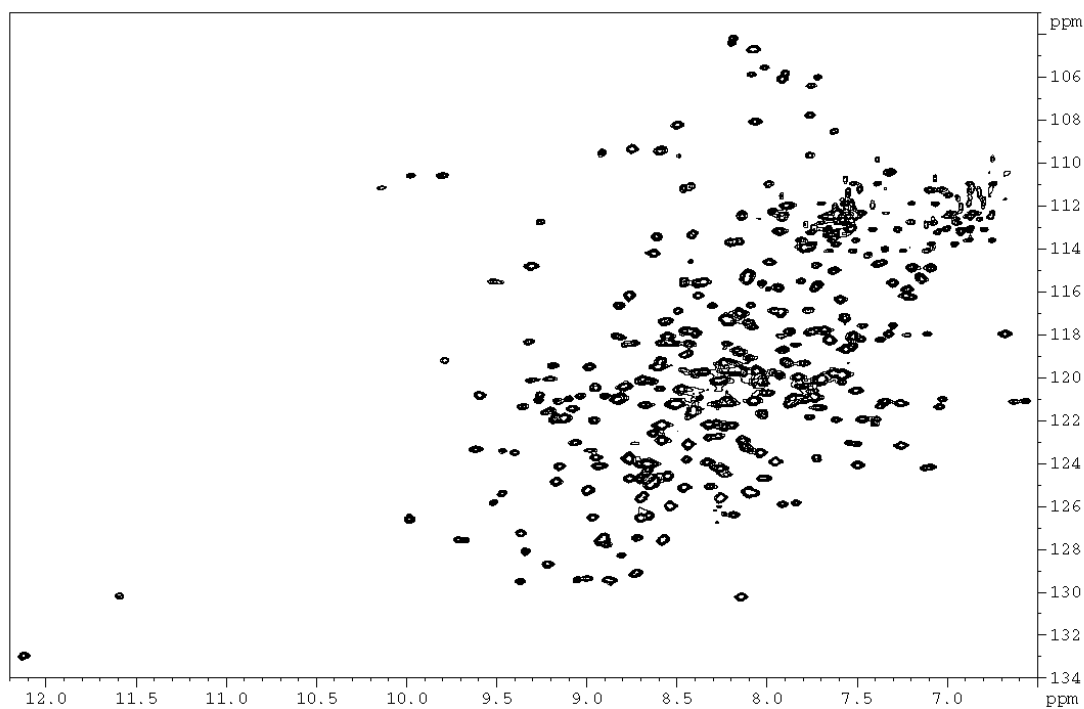


Abb. 8.2: [^{15}N , ^1H] HSQC-TROSY von 2.7 mM $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ markiertem SrfTEII, AV700, 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.75, bei 298 K vermessen.



8.5 Sequenzidentität von TycC3-PCP und ACP aus FAS *B. subtilis* mit verschiedenen PCP und ACP

Tabelle 8.7: Sequenzidentität von TycC3-PCP und ACP aus FAS *B. subtilis* mit verschiedenen PCP und ACP.

CP	Organism	Identität zu PCP TycC3	Identität zu ACP FAS <i>B. subtilis</i>
ACP	<i>Bacillus subtilis</i>	9	100
ACP	<i>E. coli</i>	20	61
ACP	<i>Aquifex aeolicus</i>	20	56
ACP	<i>Azospirillum brasilense</i>	10	59
ACP	<i>Treponema pallidum</i>	8	40
ACP	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	10	58
ACP	<i>Psychotria psychotrioides</i> <i>chlorolast</i>	6	45
ACP	<i>Rhizobium meliloti</i>	10	53
ACP	<i>Avicennia marina</i>	10	50
ACP	<i>Helicobacter pylori</i> J99	8	52
ACP	<i>Haemophilus influenzae</i>	12	68
PCP-TycA	<i>B. brevis</i>	35	10
PCP-TycB3	<i>B. brevis</i>	36	7
PCP-GrsA	<i>B. brevis</i>	52	14
PCP-BacA4	<i>B. licheniformis</i>	36	9
PCP-BacB2	<i>B. licheniformis</i>	41	10
PCP-BacC2	<i>B. licheniformis</i>	45	12
PCP-SrfA3	<i>B. subtilis</i>	45	9
PCP-TycB1	<i>B. brevis</i>	55	10
PCP-TycC3	<i>B. brevis</i>	100	9
PCP-GrsB1	<i>B. brevis</i>	39	21
PCP-GrsB2	<i>B. brevis</i>	34	14
PCP-BacC1	<i>B. licheniformis</i>	30	18
PCP-BacC3	<i>B. licheniformis</i>	45	21
PCP-SrfB2	<i>B. subtilis</i>	35	13

Danksagung

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung meiner Arbeit, die Förderung meiner Beiträge und meiner Person, sowohl beruflich als auch privat, und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Insbesondere für die interessanten und intensiven Gespräche und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Robert Finking (Rob), Dr. Henning D. Mootz, Dr. Thomas Weber (Grotti) und Dr. Jürgen May für die exzellente und fruchtbare Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich Antje Schäfer, Stefanie Weimer, Gabriele Schimpff-Weiland, Ingeborg Schüler und Roswitha Roller-Müller für technische Hilfen und ihre Unterstützung.

Allen Kollegen und Freunden, mit denen ich zusammengearbeitet habe, danke ich für diese gemeinsame Zeit und für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Dr. Katrin Eppelmann (Tini), Dr. Uwe Linne, Veit Bergendahl, Dr. Sascha Dökel, Dr. Dirk Schwarzer, Carsten Beckering, Dr. Thomas Wendrich, Dr. Andrea Klens, Nadine Keßler, Thomas Dürfahrt, Martin Hahn, Martina Pfeiff, Stephan Grünewald, Dr. Torsten Stachelhaus und Dr. Dirk Konz.

Ich danke Dr. Klaus Reuter, Prof. Dr. Ralf Ficner, Prof. Dr. Milton Stubbs, Dr. Lutz Schmitt und Dr. Frank Bernhard für die gute Kooperation bei der Strukturanalyse diverser Proteine.

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit danke ich Robert Finking, Dr. Jürgen May, Thomas Dürfahrt, Dr. Uwe Linne und Martin Hahn.

Zuletzt möchte ich meiner Frau Sharareh Moghim und meinen Eltern größten Dank aussprechen für ihre stete und großzügige Unterschützung, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.